

Konstruktion und Charakterisierung einer lichtaktivierten Phosphodiesterase

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biochemiker Carlos Fernando Gasser

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter:

1. Prof. Dr. Andreas Möglich
2. Prof. Dr. Peter Hegemann
3. Prof. Dr. Wolfgang Gärtner

eingereicht am: 04.08.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2015

Für meinen Vater

Φύσις κρύπτεσθαι φιλεῖ.

Heraklit DK 22 B 123

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen verwendet:

C. Gasser, S. Taiber, C.-M. Yeh, C.H. Wittig, P. Hegemann, S. Ryu, F. Wunder, A. Möglich, Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-specific phosphodiesterase, *Proc. Natl Acad. Sci.*, 111 (2014) 8803–8808.

C.H. Schumacher, H.G. Körschen, C. Nicol, C. Gasser, R. Seifert, M. Schwärzel, A. Möglich, A fluorometric activity assay for light-regulated cyclic-nucleotide-monophosphate actuators, *Optogenetics – Methods and Protocols*, Springer, (2015), *akzeptiert*

Vorträge und Posterpräsentationen auf Tagungen und Konferenzen:

Poster

M. Luck, C. Gasser, K. Stehfest, N. Budisa, P. Hegemann, A. Möglich, New light-activated adenylate and guanylate cyclases and phosphodiesterases, Workshop UniCat: 3rd Meeting with the SAB, Berlin, (2012)

Poster

C. Gasser, P. Hegemann, A. Möglich, Engineering a red-light-activated human phosphodiesterase, Biophysik-Symposium des Instituts f. Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin, (2012)

Vortrag

Engineering the red-light-activated human phosphodiesterase LAPD, UniCat Workshop: E4/D4 Meeting, Berlin (2013)

Poster

C. Gasser, S. Taiber, C.M. Yeh, P. Hegemann, S. Ryu, F. Wunder, A. Möglich, Engineering a red-light-activated human phosphodiesterase, DFG-Forschergruppentreffen FOR 1279, Heidelberg, (2013)

Vortrag

Engineering red-light-activated human phosphodiesterases, UniCat Workshop: E4/D4 Meeting, Berlin, (2014)

Poster

C. Gasser, S. Taiber, C.M. Yeh, C.H. Schumacher, P. Hegemann, S. Ryu, F. Wunder, A. Möglich, Engineering of a red-light-activated human cGMP/cAMP-specific phosphodiesterase, Keystone Symposium on Optogenetics, Denver, Colorado, (2015)

Abstract

Photoreceptor proteins mediate specific biological responses to light in living organisms. Biological photoreceptors consist of a photosensor and an effector module. The photosensor detects light of a certain quality through the chromophore and modulates the activity of the effector, e.g., an enzyme. In eukaryotic model organisms genetically encoded photoreceptors establish optogenetics. It enables the non-invasive, reversible, and spatio-temporally precise perturbation of cellular and physiological signalling processes by light. Naturally occurring light-activated nucleotide cyclases, e.g., the bacterial photoactivated adenylate cyclase (bPAC), increase the intracellular concentration of the second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP) under blue light. Hence, PACs allow the optogenetic analysis of cAMP-dependent signalling pathways. This work complements the optogenetics of natural blue-light-regulated cyclases with the synthetic red-light-activated phosphodiesterase LAPD for degradation of cAMP and cyclic guanosine monophosphate (cGMP).

LAPD is a chimera made up of the N-terminal photosensory core domain (PCD) of a bacteriophytochrome (BPhy) and the C-terminal catalytic effector module of the cAMP/cGMP-specific *H. sapiens* Phosphodiesterase 2A (HsPDE2A). LAPD was planned *in silico* via structural superposition with the structure of *Pseudomonas aeruginosa* BPhy-PCD and of HsPDE2A. The fusion site was derived from the α -helical linker sequences between the sensor and effector modules of the parental proteins. A functional LAPD chimera was constructed by cloning with the sequence of *Deinococcus radiodurans* BPhy-PCD (amino acid residue, AA 1-506) and of catalytic HsPDE2A domain (AA 555-941), and was expressed in *E. coli*.

The proportion of Holo-LAPD with the incorporated chromophore biliverdin (BV) amounted to $97 \pm 5\%$ after expression and purification, and it spectrally and photochemically resembled the wildtype DrBPhy. Upon irradiation with red (R) and far-red light (FR), LAPD was converted to the metastable photochemical states P_{fr} (far-red) and P_r (red), respectively. Fully activated LAPD catalyzed the hydrolysis of cGMP ($v_{max} = 15.1 \pm 0.3 \mu M^{-1} nM min^{-1}$) and cAMP ($v_{max} = 6.5 \pm 0.2 \mu M nM^{-1} min^{-1}$) with rates similar to cGMP-activated wildtype HsPDE2A ($v_{max} = 2.5 \pm 0.4 \mu M nM^{-1} min^{-1}$). LAPD degraded cGMP and cAMP with ~6- and 4-fold increase of v_{max} under red light, respectively, as compared to the dark state. The activity of red-light-adapted LAPD was reduced by ~60% upon irradiation with FR and also decayed via thermal reversion in the dark. Apo-LAPD without BV showed basal PDE activity. Enzymatic activity and light regulation of LAPD linker variants depended on the linker length, which was varied by deletion and insertion of single amino acid residues. LAPD degraded cAMP in *Xenopus laevis* oocytes and light-dependently cGMP in chinese hamster ovary cells (CHO). Endogenous BV concentrations were sufficient to saturate the light effect in the PDE reporter (CHO) cell line.

LAPD contributes to the understanding of conserved signal transduction mechanisms within GAF-based signalling receptors and enables a true optogenetic approach for the control of cyclic nucleotides (cNMP) metabolism in mammalian cells with bacteriophytochrome-based synthetic photoreceptors.

Zusammenfassung

Photorezeptor-Proteine vermitteln in Lebewesen in Abhängigkeit von Licht spezifische biologische Antworten. Sie bestehen aus einem Photosensor- und einem Effektormodul. Der Photosensor detektiert über den Chromophor eine bestimmte Lichtqualität und moduliert die Aktivität des Effektors, z.B. eines Enzyms. In eukaryotischen Modellorganismen begründen genetisch kodierte Photorezeptoren die Optogenetik. Sie ermöglicht die nicht-invasive, reversible und räumlich-zeitlich präzise Perturbation von zellulären und physiologischen Signalprozessen durch Licht. Natürliche lichtaktivierte Nukleotidylzyklasen, wie die bakterielle photoaktivierte Adenylylzyklase (bPAC), steigern die intrazelluläre Konzentration des Botenstoffs zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) durch Blaulicht. Damit erlauben sie die optogenetische Analyse von cAMP-abhängigen biologischen Signalwegen. Die vorliegende Arbeit komplementiert den optogenetischen Anwendungsbereich der natürlichen blaulichtgesteuerten Zyklen durch die synthetische rotlichtaktivierte Phosphodiesterase LAPD zur Degradation von cAMP und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP).

LAPD ist eine Chimäre aus dem N-terminalen Photosensormodul (PCD, *photosensory core domain*) eines Bakteriophytochroms (BPhy) und dem C-terminalen katalytischen Effektormodul der cAMP/cGMP-spezifischen *H. sapiens* Phosphodiesterase 2A (HsPDE2A). LAPD wurde *in silico* durch strukturelle Überlagerung der Struktur von *Pseudomonas aeruginosa* BPhy-PCD und von HsPDE2A geplant. Die Fusionsstelle wurde von den α -helikalen Linkersequenzen zwischen den Sensor- und Effektormodulen der parentalen Proteine abgeleitet. Eine funktionale LAPD-Chimäre wurde durch Klonierung mit der Sequenz von *Deinococcus radiodurans* BPhy-PCD (AS 1-506) und katalytischer HsPDE2A-Domäne (AS 555-941) konstruiert und in *E. coli* exprimiert.

Der Anteil an Holo-LAPD mit dem Chromophor Biliverdin (BV) betrug nach Expression und Reinigung $97 \pm 5\%$ und entsprach spektral und photochemisch dem Wildtyp-DrBPhy. Durch Bestrahlung mit Rot- (R) und Fernrotlicht (FR) wurde LAPD in die metastabilen photochemischen Zustände P_{fr} (fernrot) bzw. P_r (rot) umgewandelt. Vollständig aktivierte LAPD katalysierte die Hydrolyse von cGMP ($v_{max} = 15,1 \pm 0,3 \mu M nM^{-1} min^{-1}$) und cAMP ($v_{max} = 6,5 \pm 0,2 \mu M nM^{-1} min^{-1}$) in derselben Größenordnung wie cGMP-aktivierte Wildtyp-HsPDE2A ($v_{max} = 2,5 \pm 0,4 \mu M nM^{-1} min^{-1}$). LAPD degradierte cGMP und cAMP bei ~6- bzw. ~4-facher Steigerung von v_{max} unter Rotlicht im Vergleich zu dunkeladaptiertem Enzym. Die Aktivität von rotlichtadaptierter LAPD wurde durch Beleuchtung mit FR um ~60% reduziert und zerfiel ebenfalls durch thermische Reversion im Dunkeln. Apo-LAPD ohne BV zeigte eine basale Aktivität. Die enzymatische Aktivität und Lichtregulation von LAPD-Linkervarianten waren abhängig von der Linkerlänge, die durch Deletion und Insertion von einzelnen Aminosäureresten variiert wurde. LAPD degradierte cAMP in *Xenopus laevis* Oozyten und lichtabhängig cGMP in CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*). Dabei reichte die endogene BV-Konzentration in der PDE-Reporterzelle (CHO) zur Sättigung des Lichteffekts aus.

LAPD trägt zum Verständnis der in GAF-basierten Signalrezeptoren konservierten Signaltransduktion bei und ermöglicht einen rein optogenetischen Ansatz zur Kontrolle des cNMP-Stoffwechsels in Säugerzellen mit Bakteriophytochrom-basierten synthetischen Photorezeptoren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Photorezeptoren.....	1
1.2	Phytochrome.....	4
1.2.1	Pflanzliche Phytochrome.....	6
1.2.2	Bakteriophytochrome	6
1.2.3	Modularer Aufbau von Phytochromen	7
1.2.4	Lineare Tetrapyrrol-Chromophore in Phytochromen.....	8
1.2.5	Tetrapyrrol-Einbau in Phytochrome	9
1.2.6	UV/vis-Spektren von Phytochromen.....	10
1.2.7	Photozyklus von Phytochromen	12
1.2.8	Phytochrom-Histidinkinasen	13
1.2.9	Struktur von Phytochromen	14
1.2.10	Strukturelle Kopplung von linearem Tetrapyrrol und Chromophorbindungsstasche (CBD)	15
1.2.11	Mechanismus der Signaltransduktion in Bakteriophytochromen.....	19
1.3	Optogenetik.....	20
1.4	Synthetische Photorezeptoren	22
1.4.1	Phytochrom-basierte synthetische Photorezeptoren	25
1.4.2	Bioverfügbarkeit von linearen Tetrapyrrol-Chromophoren	27
1.5	Zyklisches-Nukleotid-spezifische Phosphodiesterasen.....	29
1.5.1	Die Botenstoffe cAMP und cGMP.....	29
1.5.2	Die Phosphodiesterase-Superfamilie in Säugern	30
1.5.3	Struktur, Katalyse und cNMP-Bindung der katalytischen Domäne von Säuger-Phosphodiesterasen (PDEs)	33
1.5.4	Spezifität von Phosphodiesterasen für zyklische Nukleotide	33
1.5.5	Hydrolyse von zyklischen Nukleotiden durch Phosphodiesterasen.....	35
1.5.6	Struktur der regulatorischen Module von Säuger-Phosphodiesterasen	35
1.5.7	GAF-Tandems in Säuger-Phosphodiesterasen	36
1.5.8	Humane Phosphodiesterase 2A.....	36
1.5.9	PDE2A-Struktur und -Mechanismus.....	37
1.6	Ziel der Arbeit.....	41
2	Material und Methoden	43
2.1	Medien und Puffer.....	43
2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	43
2.2.1	Kulturen zur Plasmidisolierung.....	44
2.2.2	Expressionstests in <i>E. coli</i>	44
2.2.3	Expressionskultur	45
2.2.4	Einführung von Transformationskompetenz	45

2.2.5	Herstellung von Stammkulturen	46
2.2.6	Festes Medium.....	46
2.3	Eukaryotische Zellkultur	47
2.3.1	Aktivierung und Herstellung von CHO-Stammkulturen	47
2.3.2	Kultivierung von CHO-Zellen	47
2.3.3	Transfektion von CHO-Zellen	48
2.3.4	<i>In-vivo</i> -Assay in PDE-Reporterzellen	48
2.4	Elektrophysiologie mit Oozyten	49
2.4.1	Präparation von Oozyten.....	49
2.4.2	Injektion von Oozyten.....	49
2.4.3	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme.....	49
2.5	Molekularbiologie	50
2.5.1	Transformation von <i>E. coli</i>	50
2.5.2	Plasmidisolierung	50
2.5.3	Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit.....	51
2.5.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	51
2.5.5	Reinigung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen und Restriktionsansätzen und von Plasmiden aus Mutagenese-Ansätzen	51
2.5.6	Sequenzierung von DNA.....	52
2.5.7	Klonierung.....	52
2.5.8	Ortsgerichtete Mutagenese	53
2.5.9	mRNA-Herstellung (<i>In-vitro</i> -Transkription).....	55
2.6	Proteinchemie	55
2.6.1	Zellernte, Zellaufschluss und Affinitätschromatographie	55
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie Silber-, Coomassie-Brilliant-Blue- und Zn-induzierter Fluoreszenznachweis .	56
2.6.3	Immunblot (Western Blot).....	57
2.6.4	HPLC-basierter <i>In-vitro</i> -PDE-Assay	58
2.6.5	Fluoreszenz-basierter <i>In-vitro</i> -PDE-Assay.....	60
2.7	UV/vis-Absorptionsspektroskopie	61
2.7.1	Rückkehrkinetik aus dem Photorezeptor-Signalzustand	62
2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	62
2.7.3	Biliverdin-Bestimmung in Phytochromen	62
2.8	Bioinformatik	63
2.8.1	Planung von Klonierungen	63
2.8.2	Strukturanalyse	63
3	Ergebnisse.....	64
3.1	Entwurf und Expression von lichtaktivierten Phosphodiesterasen	64
3.1.1	<i>In-silico</i> -Planung von Bakteriophytochrom-Phosphodiesterase-2A- Chimären	64

3.1.2	Klonierung der Bakteriophytochrom-Phosphodiesterase-2A-Chimäre LAPD+2	67
3.1.3	<i>In-vitro</i> -Chromophoreinbau in LAPD+2.....	68
3.1.4	<i>In-vivo</i> -Rekonstitution von Holo-DrBPhy-PCD-Konstrukten mit Biliverdin in CmpX13-Zellen.....	68
3.1.5	Koexpression von pKT270-SsHämoxygenase 1 und tRNA-Helferplasmid aus Rosetta (DE3)	71
3.1.6	Expression von LAPD+2 im pET28c(+)-Vektor.....	72
3.1.7	<i>E.-coli</i> -adaptierte Kodonbenutzung bei LAPD+2-Expression.....	73
3.1.8	Expression von LAPD+2 im pBADM-30(+)-Vektor.....	74
3.1.9	Expression von LAPD+2 im pASK43(+)-Vektor	76
3.2	Charakterisierung von LAPD <i>in vitro</i>	80
3.2.1	UV/vis-Spektroskopie und Photochemie von LAPD.....	82
3.2.2	Enzymatische Aktivität von LAPD.....	87
3.3	Mechanistische Analyse: Funktion von Linker und Chromophor bei der Signaltransduktion von LAPD.....	93
3.3.1	LAPD-Linkervarianten	93
3.3.2	Aktivität von Apo-LAPD	95
3.4	<i>In-vivo</i> -Aktivität von LAPD	97
3.4.1	Elektrophysiologische Messungen an Oozyten	97
3.4.2	LAPD-Aktivität in einer eukaryotischen PDE-Reporterzelle	103
4	Diskussion.....	111
4.1	Austauschbarkeit, Signaltransduktion und Konstruktion von bestimmten Signalrezeptoren	111
4.1.1	Austauschbarkeit von Sensor- und Effektormodulen in bestimmten Signalrezeptoren.....	111
4.1.2	Signaltransduktionsmechanismus von LAPD	119
4.1.3	Konstruktion von bestimmten Signalrezeptoren.....	131
4.1.4	Fazit: Signaltransduktionsmechanismus von LAPD und abgeleitete Konstruktionsregeln	136
4.1.5	Ausblick: Analyse der Signaltransduktion	139
4.2	LAPD als optogenetisches Werkzeug	142
4.2.1	Eigenschaften von LAPD im zellulären Kontext.....	142
4.2.2	Anwendung von LAPD <i>in vivo</i>	147
4.2.3	Eine Bakteriophytochrom-basierte Optogenetik.....	150
4.2.4	Ausblick: Optogenetik mit LAPD.....	155
5	Anhang.....	157
5.1	Strukturelles Alignment	157
5.1.1	Ausgabe des PDBe-Servers.....	157
5.1.2	Initiale Fusionsstelle	157
5.1.3	Strukturmodell von LAPD	158
5.2	PaBPhy-HsPDE-Chimäre.....	159
		XV

5.2.1	Expression und Reinigung von <i>PaBPD+2</i>	159
5.2.2	UV/vis-Spektroskopie von <i>PaBPD+2</i>	160
5.2.3	Photochemie von <i>PaBPD+2</i>	161
5.2.4	Enzymatische Aktivität von <i>PaBPD+2</i>	161
5.3	Wildtyp- und Fusionssequenzen	164
5.4	Gensynthese und PCR-Bedingungen.....	176
5.4.1	Gensynthesen	176
5.4.2	Klonierungen.....	177
5.4.3	Mutagenese	185
5.5	Abkürzungen.....	187
5.6	Abbildungsverzeichnis.....	191
6	Literaturverzeichnis	194
	Danksagung	212
	Eigenständigkeitserklärung.....	213

1 Einleitung

1.1 Photorezeptoren

Licht ist ein essentieller Träger von Energie und Information für Lebewesen [1]. Die Strahlungsenergie ($h\nu$) wird durch die Photosynthese in biochemisch verwertbare freie Standardenthalpie ($\Delta G^{\circ'}$) umgewandelt [2]. Die Lichtabsorption erfolgt über Lichtsammelkomplexe (LHCs, *light-harvesting complexes*) in Pflanzen und Algen letztlich durch das zyklische Tetrapyrrol Chlorophyll [3]. In den Photosystemen II und I treibt die Lichtenergie dabei einen lichtabhängigen Elektronentransport auf Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP^+) unter Spaltung von Wasser (Photolyse) und Sauerstoffaustritt (O_2) an [4]. Reduziertes NADP ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) liefert schließlich die Reduktionsäquivalente für die Traubenzuckersynthese ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) aus Kohlendioxid (CO_2) in der lichtunabhängigen Reaktion des Calvinzyklus [5].

Durch Licht übertragene Informationen über die Umwelt werden in Organismen auf molekularer Ebene durch biologische Photorezeptoren integriert [6]. Diese photosensorischen Proteine vermitteln bei Detektion einer bestimmten Lichtqualität eine biologisch adäquate Reaktion, was Selektionsvorteile für eine Spezies mit Photorezeptoren durch Adaptation an die entsprechende ökologische Nische bedeutet [7]. In Pflanzen detektiert beispielsweise der Rotlichtrezeptor Phytochrom (Phy) das Verhältnis von rotem (R) und fern-rotem Licht (FR) [8]. In schattigen Vegetationsschichten mit niedrigem R/FR-Verhältnis induzieren Phytochrome eine Schattenvermeidung (Abbildung 1), wodurch die maximale Photosyntheserate erhöht wird [9].

Im Gegensatz dazu haben Tiere spezialisierte Organe und Gewebe zur Lichtwahrnehmung entwickelt, die die räumliche Auflösung der Lichtdetektion ermöglichen, beispielsweise das Wirbeltierauge [10]. Analog besitzen Protisten spezifische Organellen, wie *Euglena gracilis* den Augenfleck [11], wo der Blaulichtrezeptor euPAC (*photoactivated adenylate cyclase*) [12] im kristallinen paraflagellaren Körper regelmäßig orientiert ist [13]. Unter starkem Blaulicht induziert euPAC in *E. gracilis* eine negative Phototaxis zum Schutz des photosynthetischen Apparats.

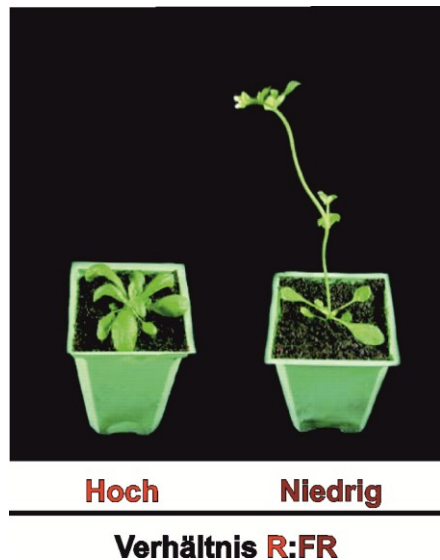


Abbildung 1. Schattenvermeidung bei Landpflanzen. Wachstum von *Arabidopsis thaliana* unter hohem oder niedrigem R:FR-Verhältnis, wie es bei Tageslicht bzw. im Schatten vorherrscht. Pflanzen wurden Weißlicht gleichmäßiger photosynthetisch aktiver Strahlung (400-700 nm) (links) und zusätzlichem FR-Licht (rechts) ausgesetzt, um das R:FR-Verhältnis zu reduzieren [14]. Je höher der FR-Anteil ist, desto stärker die Wachstumsbewegung und damit die Schattenvermeidung.

Photorezeptor-Proteine zeigen in der Regel einen modularen Aufbau aus Photosensor- und Effektordomänen [15] (Abbildung 2). In bestimmten Photorezeptoren, wie dem lichtaktivierten Ionenkanal Kanalrhodopsin (ChR), werden Sensor- und Effektormodul durch dieselbe Proteindomäne dargestellt [16]. Photorezeptoren sind als modulare Signalproteine aus N-terminalen photosensorischen und C-terminalen effektorischen Domänen aufgebaut [17]. Von dieser Topologie weichen Ausnahmen ab, z.B. die Aureochrome mit N-terminalem DNA-bindendem basischem Zipper (bZIP) und C-terminaler LOV-Domäne (*light-oxygen-voltage*) [18].

Der Photosensor im Grundzustand absorbiert über einen Chromophor Licht einer bestimmten Qualität und geht in der Regel in einen (meta)stabilen Signalzustand über [6,7]. Das Effektormodul wird lichtabhängig aktiviert oder reprimiert und generiert bzw. reduziert letztlich eine biologische Aktivität, die Ionenkanäle und -pumpen, Enzyme, Transkriptionsfaktoren und Domänen zur Proteininteraktion umfasst [15]. Die Lebenszeit des photochemischen Signalzustands ist oft mit der Veränderung der Effektor-Aktivität gekoppelt, was die Dauer des jeweiligen Signalprozesses bestimmt [6]. Die photoaktivierte Adenylzyklase euPAC erhöht beispielsweise nach Absorption von Blaulicht durch die BLUF-Domäne (*blue-light sensors using flavin adenine dinucleotide*) die Synthese des Botenstoffs (*second messengers*)

Adenosinmonophosphat (cAMP) *in vitro* 80-fach [12]. Starkes Blaulicht führt in *E. gracilis* vermutlich intrazellulär zur lokalen Erhöhung der cAMP-Konzentration und letztlich zur photophoben Reaktion.

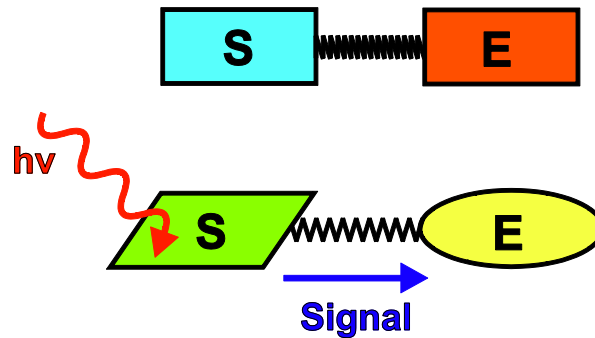


Abbildung 2. Schematischer modularer Aufbau von biologischen Photorezeptoren. Photorezeptoren sind in der Regel aus einem Sensor- (S; blau/grün) und einem Effektor-Modul (E; orange/gelb) zusammengesetzt. Das sensorische Modul detektiert Licht einer bestimmten Qualität ($h\nu$) und moduliert allosterisch die Aktivität des gekoppelten effektorischen Moduls. Das Lichtsignal wird über einen Signaltransduktionsmechanismus, an dem Konformationsänderungen beteiligt sind, in ein biologisches Signal umgewandelt [15].

Photorezeptoren lassen sich anhand ihrer photosensorischen Module in sieben verschiedene Klassen einordnen (Abbildung 3): LOV-Sensoren, Xanthopsine, Phytochrome, BLUF-Sensoren, Cryptochrome und Rhodopsine [19]; der pflanzliche UV-B-Rezeptor UVR8 (*UV resistance locus 8*) bildet eine eigene Photorezeptorklasse [20]. Biologische Photorezeptoren decken nahezu das gesamte UV/vis-Spektrum ab [21], wobei Rhodopsine [16] und die Phytochrom-Superfamilie [22] die Photorezeptorklassen mit der größten spektralen Bandbreite sind.

Der modulare Aufbau von Photorezeptoren führte zu einer Vielzahl von Sensor-Effektor-Kombinationen, die in der Evolution mutmaßlich aus Genfusion und -spaltung hervorgegangen sind [23]. Die gleiche modulare Neukombination von Genabschnitten kann konvergent mehrfach stattgefunden haben, was die Familie der Neochrome zeigt, die LOV- und Phytochrom-Sensoren in Farnen und Algen mindestens zweimal unabhängig voneinander fusioniert haben [24]. Biologische Photosensoren sind in allen sechs Lebensreichen [25,26] vertreten, wie zum Beispiel durch die phylogenetische Verteilung von LOV-Domänen in Bakterien und höheren Pflanzen [27], von

Rhodopsinen in mikrobiellen und vertebraten Organismen [16] und von Phytochromen in Cyanobakterien und Pflanzen verdeutlicht wird [28].

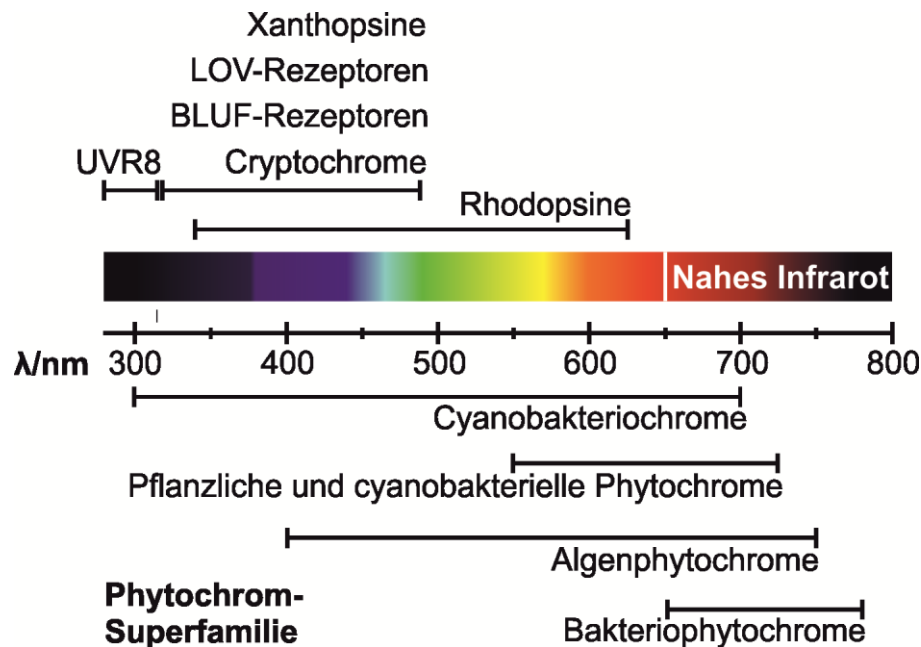


Abbildung 3. Spektrale Absorptions-Bandbreite von biologischen Photorezeptoren. Alle sieben Photorezeptorklassen decken gemeinsam nahezu den gesamten Frequenzbereich des UV/vis-Spektrums ab: UVR8 [29,30], Xanthopsine, LOV- und BLUF-Rezeptoren, Cryptochrome [30], Rhodopsine [31,32] und Phytochrome. Die Phytochrom-Superfamilie zeigt mit Absorptionen von elektromagnetischer Strahlung des UVB- bis nahen IR-Bereichs die größte spektrale Bandbreite. Wichtige Photorezeptor-Familien sind Cyanobakteriochrome [33], pflanzliche und cyanobakterielle Phytochrome [21], Algenphytochrome [22] und Bakteriophytochrome [34,35].

1.2 Phytochrome

Die Phytochrom-Superfamilie erstreckt sich phylogenetisch über nicht-photosynthetisierende und photosynthetisierende Bakterien (BPhys), Cyanobakterien (Cphs), Diatomeen (Kieselalgen) (Dphs), Pilze (Fphs), einzellige Grünalgen und Pflanzen (Phys) [36] (Abbildung 4). Cyanobakteriochrome (CBCRs) sowie bestimmte Cphs (PAS-lose Cphs, s. Abbildung 5) sind Phytochrom-verwandte Photorezeptoren, die ausschließlich in Cyanobakterien gefunden wurden [37–40].

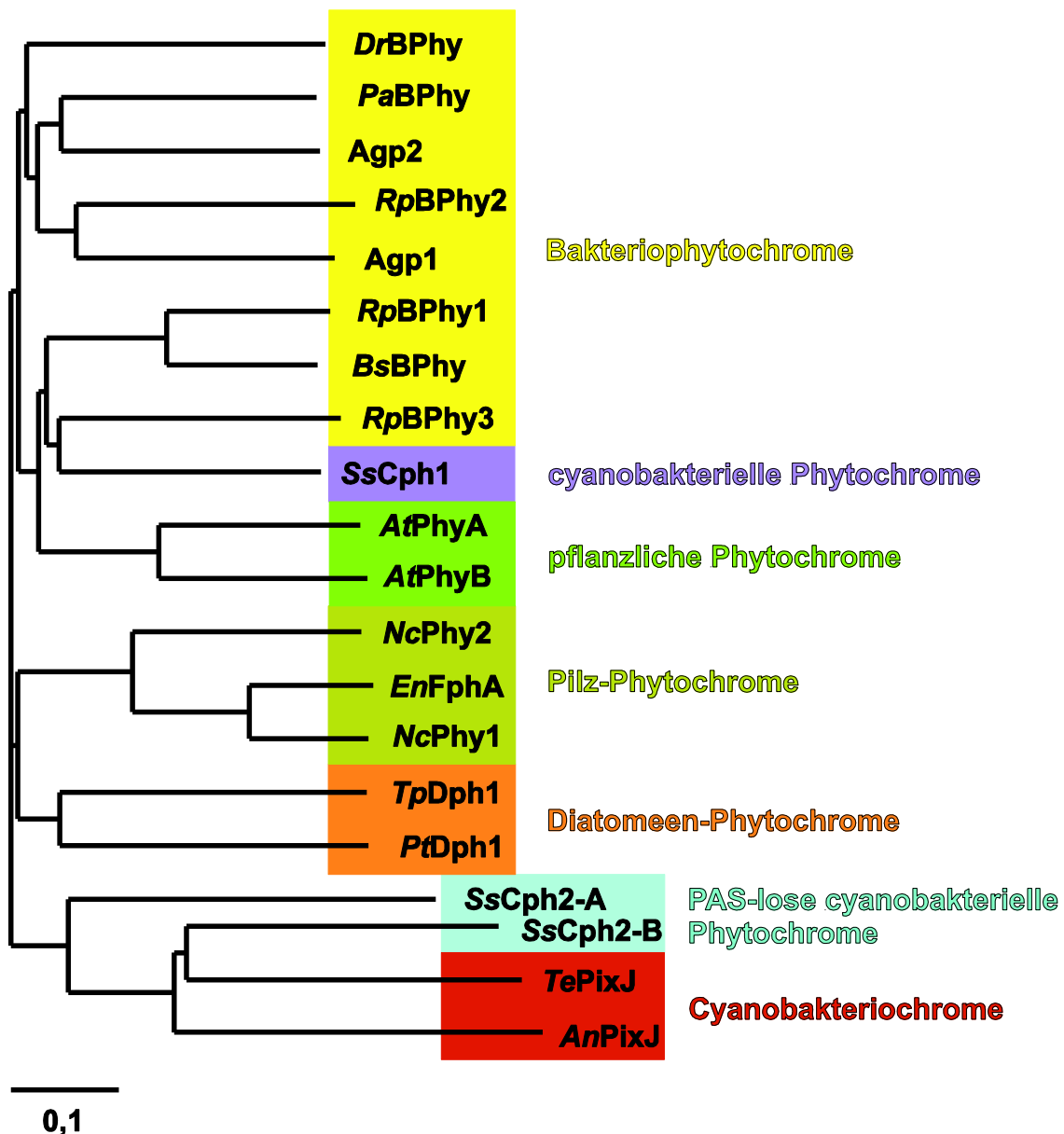


Abbildung 4. Phylogenetische Analyse der Phytochrom-Superfamilie. Ein multiples Sequenzalignment wurde anhand der (vorhergesagt) Chromophor-bindenden GAF-Domäne (Pfam-Datenbank-Annotation PF01590) mit ClustalX 2.0 [41] erstellt und die phylogenetische Analyse mit dem Neighbour-Joining-Algorithmus durchgeführt. Die relativen phylogenetischen Entfernungen wurden mit TreeView 1.6.6 dargestellt (0,1 \triangleq 10% Divergenz der Aminosäurereste). Ausgewählt wurden Spezies der Familien: Bakteriophytochrome (gelb), cyanobakterielle Phytochrome (blauviolett), pflanzliche Phytochrome (grün), Pilz-Phytochrome (hellgrün), Diatomeen-Phytochrome (orange), PAS-lose cyanobakterielle Phytochrome (hellblau), Cyanobakteriochrome (rot). Der phylogenetische Baum basiert auf [36]. Uniprot-ID-Nummern: *DrBPhy* (Q9RZA4/152-316), *PaBPhy* (Q9HWR3/139-303), *Agp2* (A9CI81/141-304), *RpBPhy2* (Q6N5G2/161-327), *Agp1* (Q7CY45/133-301), *RpBPhy1* (B3Q7C0/145-309), *BsBPhy* (Q8VUB7/144-308), *SsCph1* (Q55168/152-313), *RpBPhy3* (Q6NDI6/155-318), *AtPhyA* (P14712-1/218-402), *AtPhyB* (P14713/252-433), *NcPhy2* (Q45KI2/335-503), *EnFphA* (Q5K039/394-562), *NcPhy1* (Q45KI1/494-662), *TpDph1* (B8C3H5/240-413), *PtDph1* (B7FV12/198-361), *SsCph2-A* (GAF-A: Q55434/23-186), *SsCph2-B* (GAF-B: Q55434/939-1080), *TePixJ* (Q8DLC7/439-580), *AnPixJ* (Q8YXY7/234-379). Spezies-Kürzel: *Deinococcus radiodurans* (Dr), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Agrobacterium tumefaciens* (Ag), *Rhodopseudomonas palustris* (Rp), *Bradyrhizobium* sp. (Bs), *Synechocystis* sp. (Ss), *Arabidopsis thaliana* (At), *Neurospora crassa* (Nc),

Emericella nidulans (En), *Thalassiosira pseudonana* (Tp), *Phaeodactylum tricornutum* (Pt), *Thermosynechococcus elongatus* (Te), *Anabaena* sp. (An).

1.2.1 Pflanzliche Phytochrome

Phytochrome wurden zuerst als Rotlichtrezeptoren aus *Avena sativa* isoliert [42,43] und sind durch die pflanzliche Genfamilie PHYA-E kodiert [44]. Phytochrome regulieren in Algen und Pflanzen zahlreiche physiologische und entwicklungsgenetische Prozesse. Diese umfassen in Pflanzen die bereits beschriebene Schattenvermeidung, die Samenkeimung, die Blüte, die Photomorphogenese, das Hypokotyl-Längenwachstum, die Deetiolierung und die Chloroplastenbewegung sowie die Detektion der Photoperiode im zirkadianen Rhythmus, wo Phytochrome als Zeitgeber fungieren [45]. *Arabidopsis thaliana* Phytochrom B (PhyB) ist ein R/FR-Photorezeptor [46], dessen Effektor bei niedrigem R/FR-Verhältnis (\triangleq Schatten) oder Dunkelheit eine geringe biologische Aktivität besitzt [47] (s. Abschnitt 1.1). Diese besteht aus einer direkten Interaktion mit Phytochrom-interagierenden Faktoren (PIF3, 4, 5 und 7), welche im Schatten konstitutiv akkumuliert werden. Im Gegensatz dazu werden als Folge der PhyB-PIF-Interaktion bei hohem R/FR-Verhältnis (\triangleq Tageslicht) PIFs phosphoryliert und im Ubiquitin-Proteasom degradiert. PIFs gehören zur Superfamilie der basischen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren (bHLH-TFs) [45], und sie induzieren durch direkte Bindung an ein DNA-G-Box-Motiv die Transkription von Genen der Auxin-Synthese [8]. Diese leitet die lichtabhängige, gerichtete Wachstumsbewegung zur Schattenvermeidung ein [48]. Der Phytochrom-PIF-Signalweg zur Schattenvermeidung ist mit Signalwegen der Blaulichtrezeptoren Phototropin und Cryptochrom sowie von UVR8 gekoppelt [8,49,50].

1.2.2 Bakteriophytochrome

Bakteriophytochrome sind bakterielle Homologe der pflanzlichen Phytochrome und wurden mit Cph1 als erstem Vertreter im Cyanobakterium *Synechocystis* sp. beschrieben [51]. Im photosynthetisierenden Proteobakterium *Rhodospseudomonas palustris* modulieren die Bakteriophytochrome RpBPhy2 und RpBPhy3 neben der Zellatmung die Synthese des bakteriellen Lichtsammelkomplexes (LHC) und von Karotinoiden [52,53]. Im nicht-photosynthetisierenden gramnegativen Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* reguliert PaBPhy das Quorum-sensing, d.h. die Detektion der Zelldichte durch die Einzelzelle in der Bakterienpopulation [54]. Im extremophilen

Bakterium *Deinococcus radiodurans* kontrolliert BPhy über Regulation der Deinoxanthin-Synthese die Antwort auf photooxidativen Stress [55].

1.2.3 Modularer Aufbau von Phytochromen

Das photosensorische Modul von Phytochromen besteht aus einem N-terminalen konservierten PAS-GAF-PHY-Domänentandem (*Per-ARNT-Sim*; *cGMP phosphodiesterase/adenylyl cyclase/Eh1A*; *phytochrome*) und wird als PCD (*photosensory core domain*) bezeichnet (Abbildung 5). Die PCDs der cyanobakteriellen Cphs ohne PAS-Domäne (*PAS-less Cphs*) weichen mit einem GAF-PHY-Tandem von dieser Konfiguration ab, und der Photosensor der CBCRs zeichnet sich durch repetitive GAF-Domänen aus [7]. Phytochrome binden über ihr photosensorisches Modul ein lineares Tetrapyrrol als Chromophor [56].

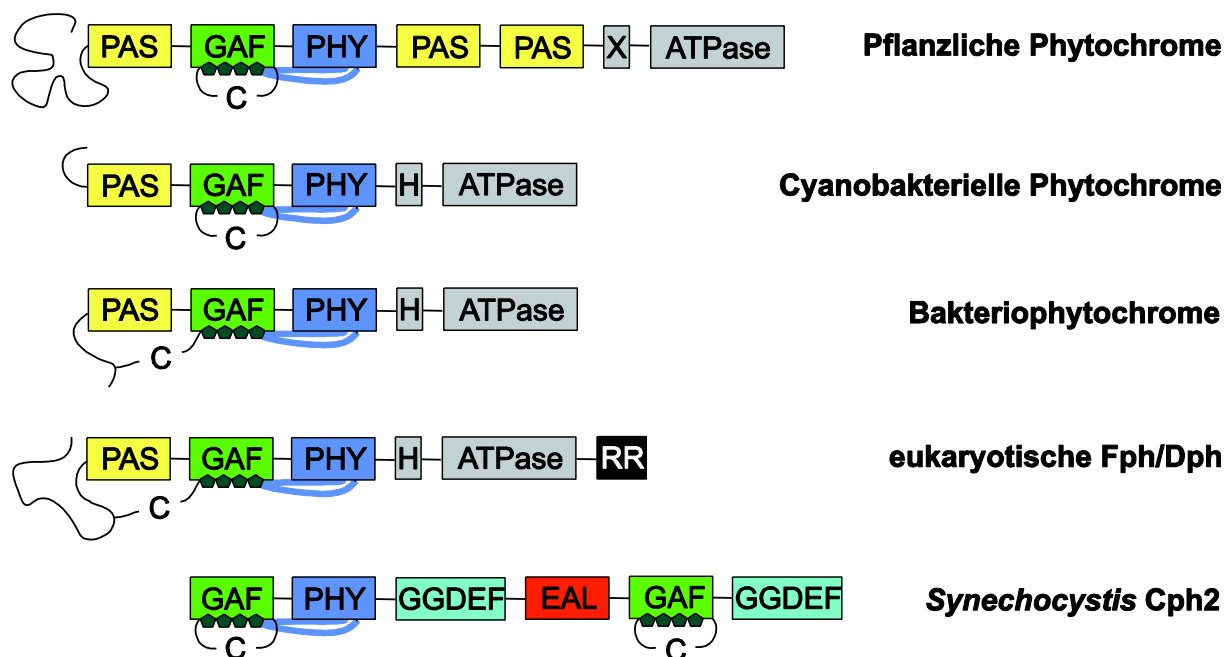


Abbildung 5. Domänenarchitektur und Chromophorkonfiguration innerhalb der Phytochrom-Superfamilie. R/FR-Phytochrome sind durch ein konserviertes PCD-Modul aus einem PAS-GAF-PHY-Domänentandem charakterisiert, wobei der lineare Tetrapyrrol-Chromophor hauptsächlich durch die GAF-Domäne eingebettet wird. GAF- und PHY-Domäne interagieren nicht-kovalent über eine Schleife der PHY-Domäne, die sogenannte PHY-Zunge (blau), die mit dem linearen Tetrapyrrol-Chromophor wechselwirkt. Die einzelnen Phytochrom-Familien zeigen Variationen dieser Konfiguration: Pflanzen- und einige Algenphytochrome tragen C-terminal der PCD ein zusätzliches PAS-Domänenpaar und entbehren in einer Histidinkinase (HK)-ähnlichen Domäne den Phosphoakzeptor-Histidinrest, der in Bakteriophytochromen, Pilz-, Diatomeen- und cyanobakteriellen Phytochromen mit funktionaler HK, einer ATPase, konserviert ist (X bzw. H). Bakteriophytochrome und verwandte Photorezeptoren aus Pilzen (Fph) und Diatomeen (Dph) unterscheiden sich von pflanzlichen und cyanobakteriellen Phytochromen durch die Position des konservierten Cys-Rests (C), der zum linearen Tetrapyrrol in kovalenter Verknüpfung steht. Pflanzen-, Pilz- und Diatomeen-Phytochrome weisen

N-terminale Extensionen auf, während Fph- und Dph-Phytochrome C-terminale Response-Regulator-Domänen (RR) tragen. Bei Bakteriophytochromen, Pilz- und Diatomeen-Phytochromen bildet dieser N-Terminus mit der GAF-Domäne eine charakteristische Knotenstruktur aus. Cph2-Sensoren konservieren das GAF-PHY-Tandem, wobei die PAS-Domäne und die PAS/GAF-Knotenstruktur fehlen. *Synechocystis* Cph2 hat eine zusätzliche GAF-Domäne, die zu den B/G (blau/grün)-CBCRs gehört, sowie effektorische Diguanylylzyklase- und Phosphodiesterase-Module (AS-Motive: GGDEF bzw. EAL). Im Gegensatz dazu tragen die meisten Cph2-Sensoren effektorische HK-Module. Die Abbildung ist [7] nachempfunden.

Die C-terminalen Effektor-Module von cyano- und proteobakteriellen sowie eukaryotischen Fph- und Dph-Phytochromen sind in der Regel Histidinkinasen (HK) [57] (Abbildung 5). Pflanzen- und einige Algenphytochrome tragen zwischen Photosensor- und Effektor-Modul ein PAS-Tandem und entbehren den konservierten Histidin-Phosphoakzeptor in einer HK-ähnlichen Domäne [7]. Nicht-kanonische Bakteriophytochrome [52,58] haben als Effektoren Diguanylylzyklase-, c-di-GMP-Phosphodiesterase- (zyklisches di-Guanosinmonophosphat; AS-Motive: GGDEF bzw. EAL) [59] und PAS-Domänen. Letztere vermitteln lichtabhängige Proteininteraktionen wie zwischen *Rhodospseudomonas palustris* BPhy1 und dem transkriptionellen Repressor PpsR2 [53,60].

1.2.4 Lineare Tetrapyrrol-Chromophore in Phytochromen

Pflanzliche und cyanobakterielle Phytochrome inkorporieren die linearen Tetrapyrrole Phytochromobilin (PΦB) bzw. Phycocyanobilin (PCB) und binden diese kovalent (Abbildung 6A). Die Bindung erfolgt zwischen einem konservierten Cysteinrest innerhalb der GAF-Domäne (z.B. *A. thaliana* PhyB C357) und dem C3¹-Kohlenstoff der Ethylgruppe des linearen Tetrapyrrols [61]. Der Tetrapyrrol-A-Ring ist bei beiden linearen Tetrapyrrolen reduziert, jedoch unterscheiden sich PCB und PΦB durch eine Ethyl- bzw. Vinylgruppe am C18-Kohlenstoff [7,62]. Im Gegensatz dazu binden BPhys [55,63,64], Fphs [65,66] und vermutlich Dphs [36] in der Regel natürlicherweise Biliverdin IXα (BV) (Abbildung 6A). Der konservierte Cystein-Rest zur Chromophorbindung liegt in diesen Phytochromen N-terminal zur PAS-Domäne (z.B. bei *Deinococcus radiodurans* BPhy Cys24) [35] und wird mit BV über den C3²-Kohlenstoff kovalent verbunden, so dass das Addukt 2,3-Dihydrobiliverdin (= 2(R),3(E)-PΦB) entsteht [67,68]. Somit ist der aufsteigende Grad der π-Elektronenkonjugation des Chromophors PCB < PΦB < BV. Einige CBCRs binden neben PCB andere reduzierte Isomere wie Phycoviolobilin (PVB), Phycoerythrobilin (PEB) und Phycourubilin (PUB) [62].

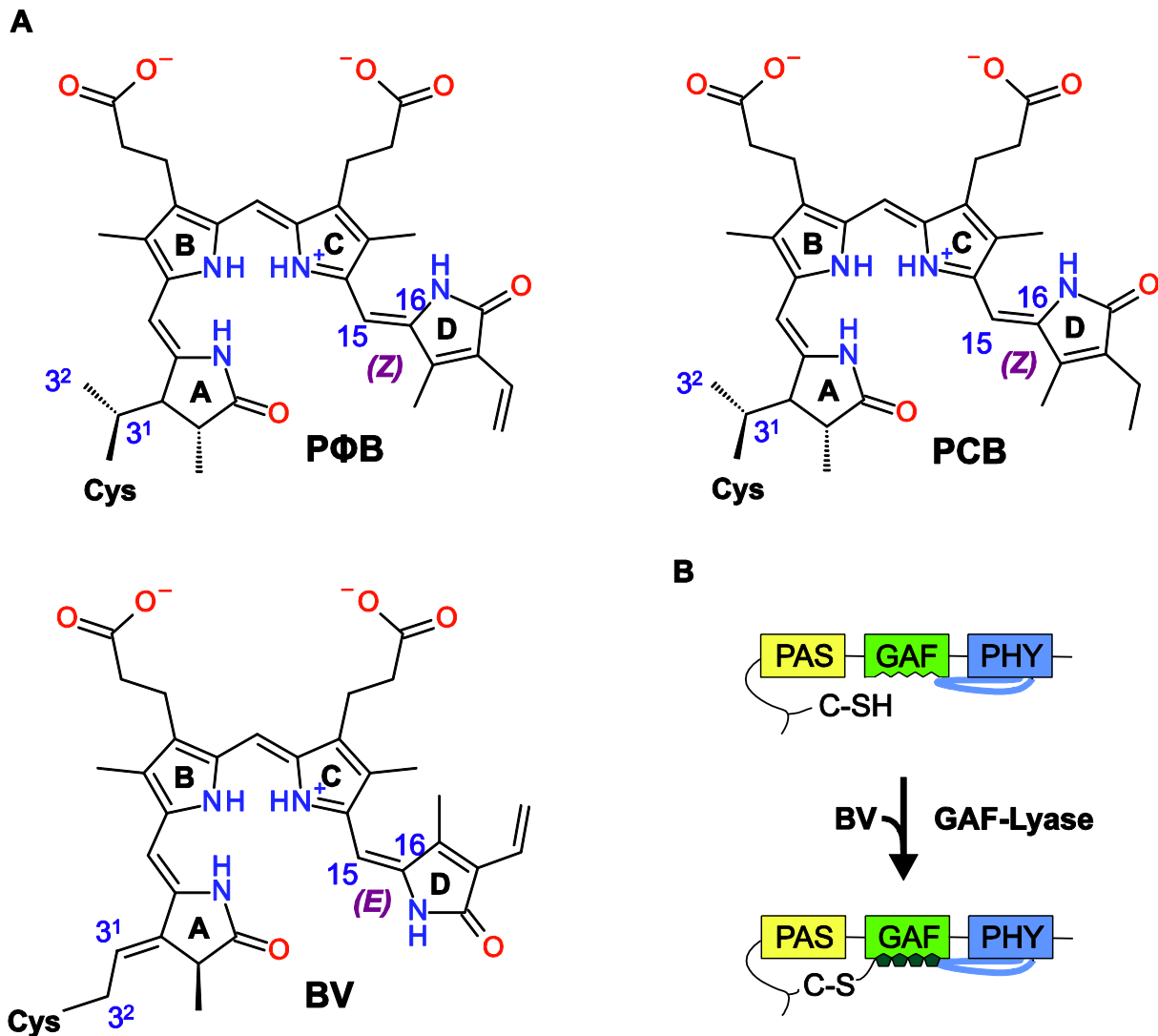


Abbildung 6. Lineare Tetrapyrrol-Chromophore von Phytochromen und Tetrapyrrol-Einbau durch das PCD-Modul. A. Pflanzliche und cyanobakterielle Phytochrome inkorporieren die reduzierten linearen Tetrapyrrole Phycocyanobilin (PCB, oben links) oder Phytochromobilin (PΦB, oben rechts), um über das C3¹-Atom ein Addukt mit einem konservierten Cys-Rest der GAF-Domäne auszubilden. In der P_r-Form liegen beide Addukte in der Konfiguration (5Z)-syn, (10Z)-syn, (15Z)-anti vor. PCB und PΦB unterscheiden sich durch eine Vinyl- bzw. Ethylgruppe am C18-Atom. Im Gegensatz dazu verwenden BPhys und Fphs Biliverdin IXα (BV, unten links) als Chromophorvorstufe, um über das C3²-Atom ein Addukt mit einem konservierten Cys-Rest (C-SH bzw. C-S) N-terminal des PAS/GAF-Knotens auszubilden. Gezeigt ist die P_{fr}-Form des BV-Addukts 2,3-Dihydrobiliverdin in der Konfiguration (5Z)-syn, (10Z)-syn, (15E)-anti. Die linearen Tetrapyrrol-Strukturen basieren auf [7]. **B.** Die Inkorporation von BV durch BPhys verläuft zunächst über nicht-kovalente Einbettung in die PCD; anschließend wird über Michael-Addition das BV-Addukt in der P_{fr}-Form gebildet (s.o.). Die Reaktion der Cys-SH-Gruppe mit dem C3²-Atom von BV wird durch die GAF-Lyase-Aktivität katalysiert. Abbildung 6B ist [21] nachempfunden.

1.2.5 Tetrapyrrol-Einbau in Phytochrome

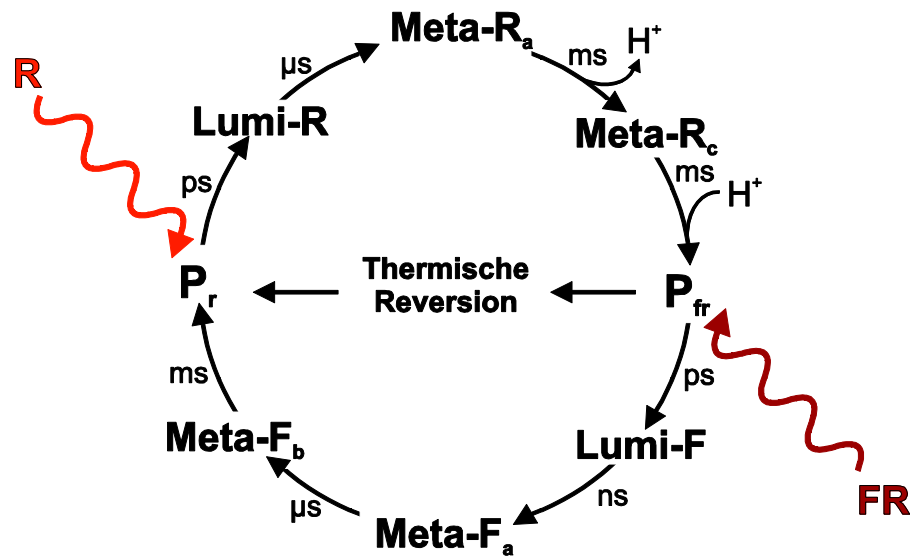
Das Tetrapyrrol wird durch die chromophorbindende Domäne (CBD) zunächst nicht-kovalent gebunden; die Ausbildung der kovalenten Bindung erfolgt in einem zweiten Schritt über die intrinsische Lyase-Aktivität der GAF-Domäne [69,70] (Abbildung 6B).

Diese katalysiert ohne zusätzliche Kofaktoren eine Michael-Addition zwischen der Thiolgruppe (reduziertes Schwefelatom) des konservierten Cysteins und der Vinylgruppe des linearen Tetrapyrrols [61]. Es wurde gezeigt, dass der Chromophoreinbau in Phytochromen reversibel sein kann [71]. Die Photosensorfunktion von Phytochromen hängt von der intrazellulären Konzentration des linearen Tetrapyrrols ab [21]. Biliverdin entsteht in bakteriellen Systemen aufgrund oxidativer Spaltung des Häm-Tetrapyrrolrings durch Hämoxygenasen (HOs) [72]. Im bakteriellen Genom werden die HOs meist durch dasselbe Operon kodiert wie die BPhys [64] und bicistronisch transkribiert [54]. In den meisten photosynthetisierenden Organismen, wie Cyanobakterien, Algen und Pflanzen, wird Biliverdin durch Ferredoxin-abhängige *Bilin*-Reduktasen (FDBRs: *ferredoxin-dependent bilin reductases*; *bilin* = Gallenfarbstoff oder lineares Tetrapyrrol) zu PCB und PΦB umgesetzt [62].

1.2.6 UV/vis-Spektren von Phytochromen

Die Chromophore von kanonischen R/FR-Phytochromen liegen im Grundzustand in der P_r -Form vor; das Absorptionsmaximum der sogenannten Q-Bande liegt im roten Spektralbereich vor ($\sim 660\text{-}710\text{ nm}$) [21,59,70,73]. Nach Anregung mit Rotlicht durchlaufen sie in der Regel einen Photozyklus mit metastabilem P_{fr} -Zustand, der Fernrotlicht absorbiert ($\sim 730\text{-}760\text{ nm}$) [21,70,73] (s. Abschnitt 1.2.7). Grundlage der photochromen Reaktion ist die Photoisomerisierung der $C15=C16$ -Doppelbindung zwischen den Pyrrol-Ringen C und D von (15Z)-*anti* nach (15E)-*anti* [35,36,74–76], was einer Rotation des D-Rings von $\sim 180^\circ$ entspricht [77,78] (Abbildung 7B). Dabei erfolgt die Drehung aufgrund sterischer Hinderung vermutlich bei Phytochromen mit PΦB und PCB gegen den Uhrzeigersinn, bei Phytochromen mit BV im Uhrzeigersinn (von der α -Seite des Tetrapyrrol-Ringsystems betrachtet; s. Abbildung 9C) [79]. Die Lage des Absorptionsmaximums von P_r und P_{fr} wird vom Delokalisationsgrad der π -Elektronen des linearen Tetrapyrrols und der Wechselwirkung mit dem CBD-Proteinanteil bestimmt [36]. Das UV/vis-Spektrum des R/FR-Phytochroms *Deinococcus radiodurans* BPhy zeigt im dunkeladaptierten Zustand eine Q-Bande bei $\lambda_{\max} \sim 700\text{ nm}$, was der akkumulierten P_r -Form von BV entspricht [64]. Neben der Q-Bande kennzeichnet das Phytochrom-Spektrum eine Soret-Bande bei $\lambda_{\max} \sim 400\text{ nm}$, die charakteristisch für lineare und zyklische Tetrapyrrole ist [70].

A



B

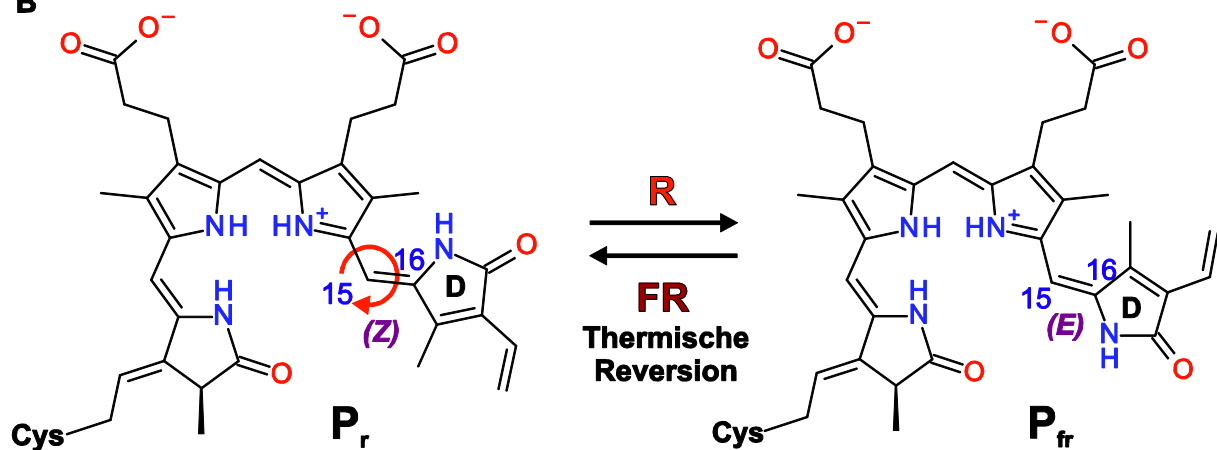


Abbildung 7. Photozyklus von kanonischem R/FR-Bakteriophytochrom und Photoisomerisierung des Biliverdin-Addukts (DrBPhy). **A.** Schematische Darstellung der Photoprodukte im Phytochrom-Photozyklus: Im Grundzustand P_r liegen alle vier Tetrapyrrolringe des BV-Chromophors protoniert vor. Durch Anregung mit Rotlicht (R) entsteht innerhalb von Pikosekunden (ps) Lumi-R, wobei eine Z \rightarrow E-Isomerisierung der C15-C16-Methin-Doppelbindung zwischen Tetrapyrrolring C und D von BV stattfindet. Thermische Relaxationsprozesse führen in Mikrosekunden (μ s) zu Meta-R_a, in Millisekunden zu deprotoniertem Meta-R_c und schließlich zu reprotoniertem P_{fr} . Der P_{fr} -Zustand kehrt langsam nicht-photochemisch in den Grundzustand P_r zurück oder durchläuft unter Fernrotlicht (FR) eine schnelle Photokonversion nach P_r . Die $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Photokonversion verläuft vermutlich über einen ähnlichen De- und Reprotonierungszyklus wie die $P_r \rightarrow P_{fr}$ -Photokonversion mit entsprechenden Intermediaten. Der Photozyklus aus Pflanzenphytochrom basiert auf [70]. **B.** Der BV-Chromophor liegt im Grundzustand in der P_r -Form vor und wird durch R-Licht in die P_{fr} -Form umgewandelt. Die $P_r \rightarrow P_{fr}$ -Konversion basiert auf der Photoisomerisierung von (15Z)-anti nach (15E)-anti, d.h. auf der Rotation des Tetrapyrrolrings D um die C15=C16-Doppelbindung. Die metastabile P_{fr} -Form wird durch thermische Reversion im Dunkeln spontan oder durch FR-Licht in P_r rekonvertiert. Die Darstellung der Photoreaktion basiert auf [7,21].

Im Gegensatz zu kanonischen R/FR-Phytochromen haben Bathyphytochrome einen FR/R-Photozyklus. Im Grundzustand von *Pseudomonas aeruginosa* BPhy (*Pa*BPhy) nimmt BV die P_{fr} -Form (ZZEssa-Konformation) an [35]. Nach Anregung mit Fernrotlicht durchläuft *Pa*BPhy einen Photozyklus mit metastabilem P_r -Zustand (ZZZssa) [80,81]. BV wird durch Bakteriophytochrome in der P_r -Form eingebaut. Bathyphytochrome relaxieren nach BV-Einbau in der P_r -Form im Dunkeln spontan in den P_{fr} -Zustand [81] (s. Abschnitt 1.2.5).

Rhodopseudomonas palustris BPhy3 zeigt unkonventionelle spektrale Eigenschaften, die von den Absorptionsmaxima der kanonischen R/FR-Phytochrome abweichen. *Rp*BPhy3 durchläuft statt einer P_r/P_{fr} - eine P_r/P_{nr} -Photokonversion; die P_{nr} (near-red)-Form absorbiert bei $\lambda_{max} \sim 650$ nm im nahen Rot-Bereich [34,82]. BPhy3 aus *Bradyrhizobium sp.* (Stamm ORS278) stellt innerhalb der Bakteriophytochrome einen Sonderfall dar, und der für proteobakterielle BPhys ungewöhnliche Chromophor PCB zeigt einen Photozyklus mit P_r (670 nm) und P_o (orange; 610 nm) [83].

1.2.7 Photozyklus von Phytochromen

Die primären Photoreaktionen der Phytochrom-Superfamilie wurden an pflanzlichen Phytochromen mit PΦB und PCB beschrieben [84,85]. In Bakteriophytochromen wird BV durch Bindung an C3²-Cys zu 2(R),3(E)-PΦB umgewandelt (s. Abschnitt 1.2.5). Als PΦB-Derivate sind die photochemischen Reaktionen von linearen Tetrapyrrolen bakterieller Phytochromen mit denjenigen von cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytochromen vergleichbar [68] (s. Abbildung 6A). Bei Anregung mit Rotlicht (~650-700 nm) wird der thermodynamisch stabile P_r -Zustand innerhalb von Pikosekunden (~10-100 ps) in das primäre Photoprodukt Lumi-R umgewandelt (Abbildung 7A). Dieser Übergang beinhaltet eine ZZZa-nach-ZZEa-Isomerisierung der C15=C16-Methingruppe [86,87] (Abbildung 7B). Thermische Relaxation führt in der Größenordnung von Mikrosekunden (~100-1000 μ s) zur Bildung des Intermediats Meta-R_a. Auf einer Zeitskala von Millisekunden (~1-10 ms) zerfällt Meta-R_a zum transient deprotonierten Intermediat Meta-R_c. Dieses wird wiederum innerhalb von Millisekunden (~100-1000 ms) zum metastabilen Photoprodukt P_{fr} reprotoniert [88]. Der P_{fr} -Zustand relaxiert in der Regel langsam über thermische Reversion im Dunkeln zum Grundzustand P_r zurück; bei *Deinococcus radiodurans* BPhy beispielsweise kehren ~30% P_r nach 2 h zurück [70]. Die Rückkehrkinetik kann durch Einführung von

Punktmutationen in GAF- und PHY-Domänen beschleunigt oder verlangsamt werden; diese Photozyklus-Mutationen beeinflussen meist die thermische Stabilität von P_r und/oder P_{fr} [89–91].

Alternativ wird P_{fr} photochemisch mittels Fernrotlicht in den P_r -Zustand umgewandelt (Abbildung 7A&B). Die Photokonversion verläuft vermutlich über einen anderen Reaktionsweg als die photochemische Hinreaktion und könnte auf einem ähnlichen invertierten Protonierungszyklus basieren [36,56,92]. Auch die Rate und Quantenausbeute der $P_r \rightarrow P_{fr}$ und $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Photokonversionen werden durch Punktmutationen innerhalb der GAF- und PHY-Domäne beeinflusst [68,70].

Die Photoisomerisierungen sind an Konformationsänderungen des Phy-Proteinteils gekoppelt. Diese ändern die Struktur und Dynamik von P_r relativ zu P_{fr} und modulieren letztlich die Aktivität des gekoppelten C-terminalen Effektors (z.B. Histidinkinase) [70].

1.2.8 Phytochrom-Histidinkinasen

PCD-gekoppelte Histidinkinasen (HKs) katalysieren in der Regel eine lichtabhängige Autophosphorylierung [35]. Dabei wird die γ -Phosphatgruppe von ATP durch die katalytische Domäne (CA; *catalytic ATP-binding*) auf einen konservierten Histidin-Rest der DHp-Domäne (*dimerization histidine phosphotransfer*) übertragen [93]. Die Autophosphorylierung erfolgt bei HKs entweder als *cis*- oder *trans*-Phosphorylierung [94], wobei letztere für Bakteriophytochrome vorgeschlagen wurde: im Dimer phosphoryliert die CA der einen Untereinheit die DHp der anderen [95]. Die Autophosphorylierung von kanonischem *Pseudomonas syringae* BPhy wurde im rotlichtadaptierten Zustand ($\triangleq P_r/P_{fr}$ -Mischzustand) als ~20-fach schneller als im P_r -Grundzustand beschrieben [64]. Kanonisches Bakteriophytochrom aus *Agrobacterium tumefaciens* (Agp1) wurde im Gegensatz dazu im P_r -Grundzustand stärker autophosphoryliert [96], was ebenso für die cyanobakteriellen Homologen gilt (z.B. Cph1) [96–98]. Das Bathyphytochrom Agp2 zeigt im P_{fr} -Grundzustand eine stärkere Autophosphorylierung [81], PaBPhy im belichteten P_r/P_{fr} -Mischzustand [99]. Als Histidinkinasen sind Bakteriophytochrome in der Regel Bestandteile von Zweikomponentensystemen. Diese bestehen zumeist aus der lichtregulierten HK und einem sogenannten Response-Regulator (RR) [55], welcher von der Histidinkinase phosphoryliert wird. Dabei wird eine Phosphatgruppe von der aktivierten DHp-Domäne auf einen spezifischen Aspartat-Rest des RR übertragen. Wie die Hämoxygenasen befindet sich der RR genomisch häufig auf demselben Operon wie

das entsprechende Bakteriophytochrom [64], wobei dieser bei bestimmten Spezies ein Teil desselben Polypeptids ist, z.B. bei Agp2 [100]. Der aktivierte Response-Regulator induziert direkt oder indirekt meist eine transkriptionelle Antwort, die zu einer lichtabhängigen Änderung der Genexpression führt [55,101]. Das Phytochrompaar *RpBPhy2* und *RpBPhy3* zeigt im P_r-Grundzustand eine höhere Autophosphorylierung als im belichteten Zustand (\triangleq R-Licht) und reguliert als Zweikomponentensystem die Transkription von Photosynthese-Genen [101]. *RpBPhy3* ist auch in der Apo-Form regulatorisch aktiv und wirkt als Redoxsensor [102]. Unter anaeroben Bedingungen, in denen kein BV synthetisiert wird, moduliert es die Expression des Lichtsammelkomplexes LHC4 [102] (s. Abschnitt 1.2.2). Im Gegensatz dazu gehört das Bathyphytochrom *RpBPhy1* zu einem Zweikomponentensystem ohne RR-Phosphorylierung durch eine Histidinkinase. Die effektorische Domäne besteht aus einem PAS-HOS (*two-helix output sensor*)-Domänentandem (s. Abschnitt 1.2.3). Unter FR-Licht interagiert *RpBPhy1* mit dem Response-Regulator *RpPpsR2* und blockiert dessen Funktion als transkriptionellen Repressor von Photosynthese-Genen [60].

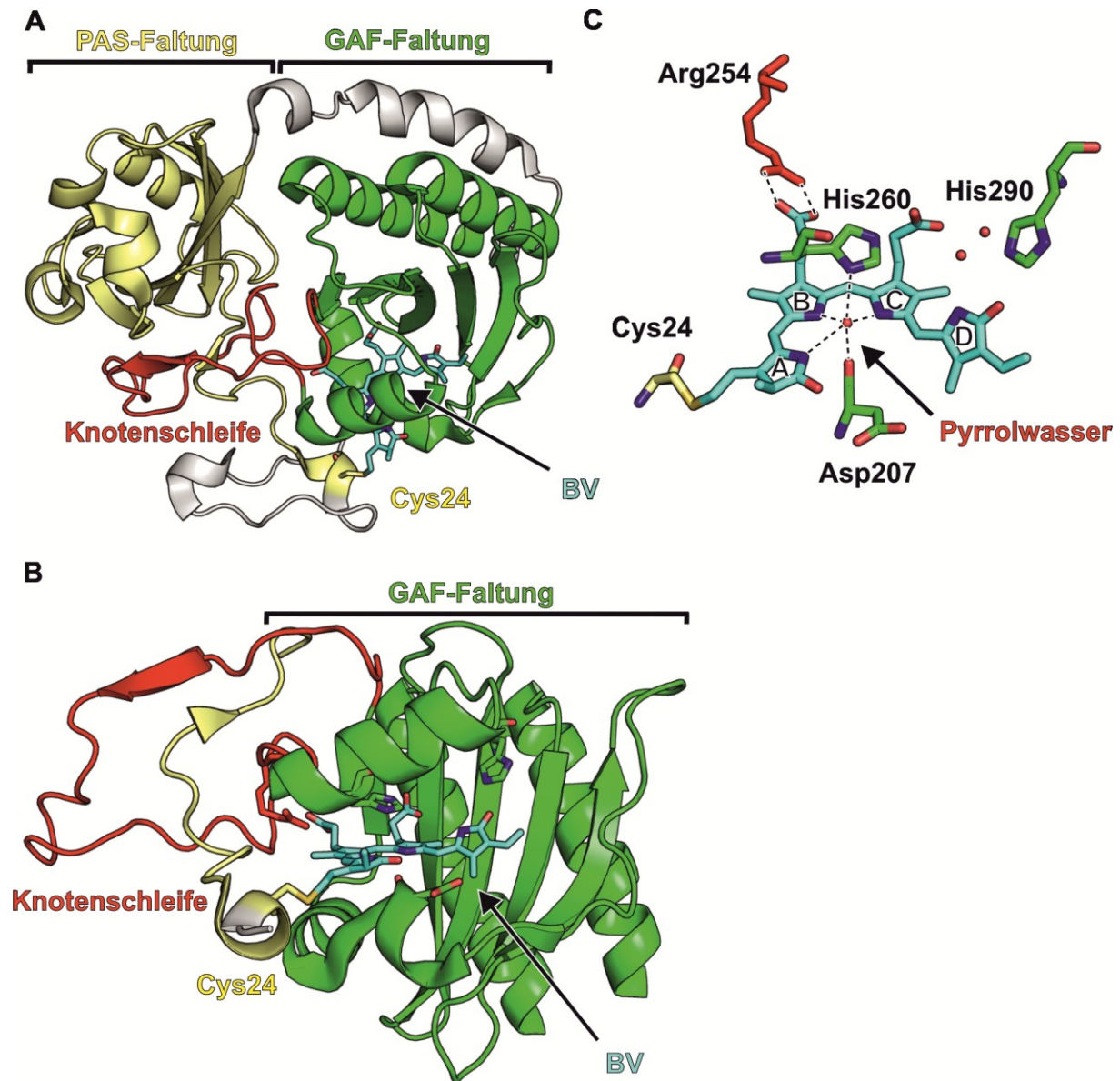
1.2.9 Struktur von Phytochromen

Die erste Raumstruktur eines vollständigen PAS-GAF-PHY-Tandems (\triangleq PCD) mit Biliverdin wurde vom bakteriellen Bathyphytochrom aus *Pseudomonas aeruginosa* (*PaBPhy*) gelöst [35] (Abbildung 9A). Die *PaBPhy*-PCD kristallisiert als paralleles Homodimer, d.h., die PAS-GAF-PHY-Untereinheiten sind Kopf an Kopf zueinander ausgerichtet. Die PCD wird vom N- zum C-Terminus von einem zentralen Helixbündel durchzogen, das von axialen Helizes der PAS-, GAF- und PHY-Domänen und verbindenden Interdomänen-Helizes an der zentralen Dimer-Grenzfläche ausgebildet wird. PAS-, GAF- und PHY-Domänen sind entlang des Helixbündels seitlich angeordnet und stehen zu diesem über Aminosäurereste in Wechselwirkung; PAS- und GAF-Domänen sowie GAF- und PHY-Domänen stehen somit über die axialen Helizes in Kontakt untereinander. Alle drei Sensor-Domänen interagieren über spezifische Aminosäurereste mit dem BV-Chromophor [35] (Abbildung 9B). PAS-, GAF- und PHY-Domänen haben trotz niedriger Sequenzidentität auf Ebene der Aminosäurereste (PAS-GAF und PAS-PHY: ~ 25%; GAF-PHY: ~10%; PAS-GAF-PHY: ~5%) untereinander ähnliche Tertiärstrukturen [35]. Bisher wurde keine BPhy-Volllängenstruktur als PCD-Histidinkinase-Konstrukt beschrieben.

1.2.10 Strukturelle Kopplung von linearem Tetrapyrrol und Chromophorbindungstasche (CBD)

Die erste CBD-Struktur eines kanonischen Phytochroms wurde durch Röntgenstrukturanalyse des *Deinococcus radiodurans* BPhy-PAS-GAF-Tandems gelöst [67] (Abbildung 8A). Der Chromophor Biliverdin wird durch Einbettung in die GAF-Domäne vom äußeren Medium abgeschirmt (Abbildung 8B). GAF-Domänen sind über zwei Milliarden Jahre konservierte Signalmodule [103] und kommen in einer Vielzahl von Signalrezeptoren in allen drei Lebensreichen vor. Sie wurden zunächst in den namensgebenden cGMP-Phosphodiesterasen, Adenylzyklasen und dem transkriptionellen Aktivator EhlA beschrieben [104] und ähneln strukturell den PAS-Domänen, wie denen der sauerstoffabhängigen Histidinkinase FixL und des Photorezeptors PYP (*photoactive yellow protein*) [105]. Die GAF-Domäne besteht aus einem sechssträngigen β -Faltblatt, das von einem dreifachen Helixbündel und zwei weiteren α -Helizes flankiert wird (Abbildung 8B). Biliverdin wird in der GAF-Bindungstasche durch hydrophobe Wechselwirkungen und ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert, wobei im Zentrum des H-Brücken-Netzwerkes das sogenannte Pyrrolwasser steht [67] (Abbildung 8C). Die Tetrapyrrol-Ringe A, B und C sind in koplanarer Konformation angeordnet; der Ring D steht im P_r -Zustand im 44° -Winkel zu dieser Ebene [68].

Die Reste D207 und H260 sind in der Phytochrom-Superfamilie invariant und nehmen über Interaktion mit den Tetrapyrrol-Ringen A, B, C und dem zentralen Pyrrolwasser eine zentrale Stellung im H-Brückennetzwerk ein [68] (Abbildung 8C). Die Mutanten DrBPhy-D207A und -H260A akkumulieren bei Anregung mit Rotlicht BV in einem Meta- R_c -ähnlichen Photoprodukt; wegen defizienter De- und Reprotonierung wird hier kein P_{fr} gebildet [70,106]. Der Rest H290 interagiert mit Ring D, der in einem hydrophoben Hohlraum liegt und im Gegensatz zu den fest koordinierten Ringen A, B, C eine größere Rotationsfreiheit besitzt (Abbildung 8C) [70]. In Bathyphytochromen stabilisiert der konservierte Rest D194 über Wechselwirkung zwischen der Carboxylat-Gruppe und BV den P_{fr} -Zustand. In kanonischen Phytochromen fehlt diese Interaktion und begünstigt vermutlich die thermische Reversion von P_{fr} nach P_r bzw. von ZZZssa nach ZZEsa [107,108].



Die PAS-Domäne liegt N-terminal zur GAF-Domäne und besteht aus einem fünfsträngigen antiparallelen β -Faltblatt, das von drei α -Helizes flankiert wird (Abbildung 8A). Gemeinsam mit den eukaryotischen Phytochromen der Pflanzen, Pilze und Diatomeen sowie der cyanobakteriellen Cph1-Familie zeichnen sich Bakteriophytochrome durch eine charakteristische Knotenstruktur in der CBD aus [7]. In der Kristallstruktur von *DrBPhy* durchlaufen die ersten 35 N-terminalen, vor der PAS-Domäne gelegenen Aminosäurereste die GAF-Haarnadelschleife zwischen Helix $\alpha 7$ und Faltblatt $\beta 9$ (Abbildung 8A&B) [67]. Der resultierende Achterknoten bewirkt neben den hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen der beteiligten Aminosäurereste die enge Packung von PAS- und GAF-Domäne in der PCD [7]. Eine spezifische Funktion wurde der Knotenstruktur bislang nicht zugeordnet [109]; die Deletion des N-Terminus der PAS-Domäne beeinträchtigt jedoch die photochemische Ausbildung des P_{fr} -Zustandes [70,110].

Die PHY-Domäne ist eine phytochromspezifische GAF-Domäne mit ähnlicher Faltung [67,111] (Abbildung 9A). Von der PHY-Domäne erstreckt sich eine Haarnadelschleife zur GAF-Domäne, die sogenannte PHY-Zunge [108], die den Chromophor vom äußeren Medium abschirmt [35,76] (Abbildung 9A). Die PHY-Zunge interagiert lateral mit Aminosäureresten der GAF-Domäne und mit dem D-Ring des BV-Chromophors (Abbildung 9B). In *Pseudomonas aeruginosa* BPhy beinhalten diese Interaktionen H-Brücken zwischen PHY-R453—GAF-D194 und PHY-S459—GAF-Y250 bzw. PHY-S459—BV-D-NH [35]. Die PHY-Zunge trägt ein in der Phytochrom-Superfamilie konserviertes Tryptophan-Motiv, PRXSF, WXE und W(G/A)G [112]. Bei deletierter PHY-Domäne wird die photochemische Ausbildung des P_{fr} -Zustands beeinträchtigt [70,110].

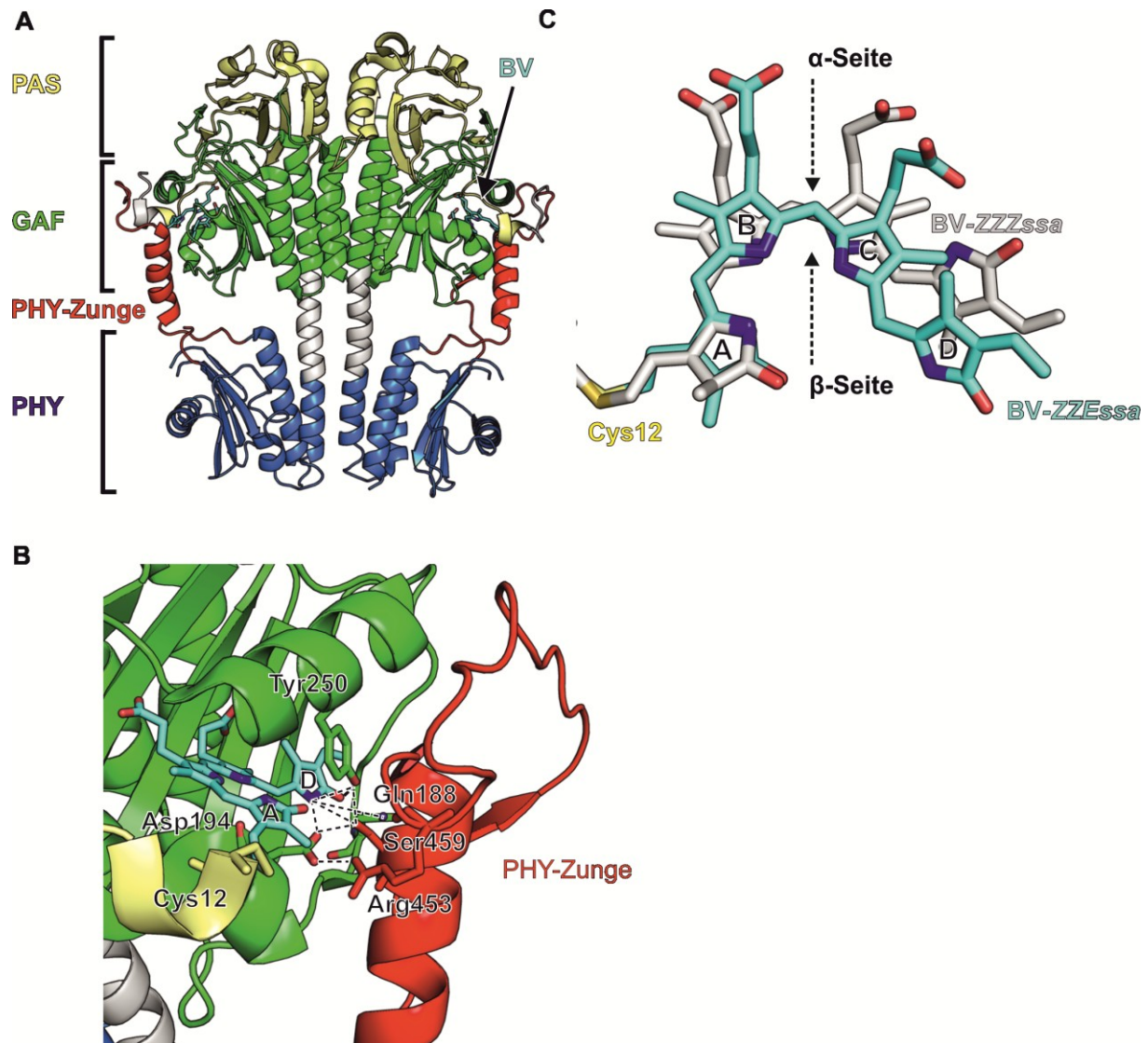


Abbildung 9. Struktur des photosensorischen Moduls (PCD) von *PaBPhy* in der P_{fr} -Form (PDB-Code: 3C2W) [35]. **A.** *PaBPhy*-PCD ist ein paralleles Dimer und zeigt eine Kopf-an-Kopf-Anordnung. PAS (gelb)-, GAF (grün)- und PHY (blau)-Domänen stehen in ausgedehnter Wechselwirkung untereinander, wobei alle drei Faltungen mit dem BV-Chromophor (hellblau) interagieren. Die sogenannte PHY-Zunge (rot) ist eine Schleife der PHY-Domäne mit α -helikalem Strukturelement und unterhält nicht-kovalente Bindungen zu GAF und BV. PAS-, GAF- und PHY-Domänen bilden zusammen mit zusätzlichen Interdomänen-Helizes (grau) ein helikales Bündel, das die gesamte Längsachse des Dimers durchzieht und einen Großteil der Dimer-Grenzfläche bildet. **B.** Die Interdomänen-Schnittstelle aus PAS-, GAF- und PHY-Faltung konvergiert am BV-Addukt: Die konservierten Aminosäurereste Tyr250, Asp194, Ser459 und Arg453 bilden ausgedehnte H-Brücken-Interaktionen (gestrichelte Linien) zum Chromophor aus, um den Tetrapyrrolring D in der (15E)-*anti*-Konfiguration zu stabilisieren (P_{fr} -Form). Dabei interagieren die Seitenketten von Tyr250 und Gln188 direkt mit der Carbonylgruppe von Ring D. **C.** Im Gegensatz zum BV-Addukt (grau) der *DrBPhy*-CBD (PDB-Code 2O9C) [68] ist in der *PaBPhy*-PCD der BV-Chromophor (hellblau) kovalent mit dem konservierten Cys12-Rest (gelb) verbunden und liegt im P_{fr} -Grundzustand in der (15E)-*anti*-Konfiguration vor (strukturelle Überlagerung). Die strukturelle Beschreibung basiert auf [35].

1.2.11 Mechanismus der Signaltransduktion in Bakteriophytochromen

Die lichtinduzierte lokale Konformationsänderung in der Chromophorregion wird letztendlich auf die Histidinkinase-Domäne übertragen [35]. Die initiale Signaltransduktion vom linearen Tetrapyrrol zum PCD-Proteinteil nach Anregung mit Rotlicht wurde durch Vergleich von Strukturen im P_r - und P_{fr} -Zustand abgeleitet. Die Mutante der *PaBPhy*-PCD Q188L stabilisiert den P_r -Zustand und imitiert damit den Signalzustand P_r des Bathyphytochroms [76] (Abbildung 9B). Die Röntgenstrukturanalyse von P_r/P_{fr} -Mischkristallen ermöglichte den Vergleich von Konformationen von Aminosäureresten beider Zustände [76]. Eine auf Grundlage dessen postulierte Trajektorie der Konformationsänderung wurde durch *Cryotrapping*-Kristallographie an *PaBPhy* belegt: Die initiale Rotation des D-Rings um die C15=C16-Doppelbindung [35] breitet sich über Verdrillungs- und Entspannungsbewegungen der Methinbrücken zunächst auf die Tetrapyrrol-Ringe B und A und anschließend auf die umgebende GAF-Proteinregion aus [99] (vgl. Abbildung 9C).

Die weitere Signaltransduktion erfolgt vermutlich in C-terminaler Richtung über die Schnittstellen von GAF- und PHY-Domänen mit dem zentralen Helixbündel, d.h. GAF-hE bzw. PHY-hA [35] (vgl. Abbildung 9A). Die zentralen GAF-hE-Helizes von 8 Kopien in der asymmetrischen Einheit (PDB-Code: 3C2W) sowie von verschiedenen BPhy-Strukturen zeigen eine Abweichung der relativen Orientierung; diese hohe Plastizität spricht für den Signalübertragungsprozess über die ausgedehnten Helixbündel [35]. Das Tryptophanmotiv der PHY-Zunge ist in allen Phytochromen mit GAF-PHY-Tandem dabei vermutlich ein zentrales Schaltelement der lichtabhängigen Konformationsänderung: Dem P_r -Zustand wird eine PHY-Zunge mit β -Faltblatt-Konformation, dem P_{fr} -Zustand eine PHY-Zunge mit helikaler Konformation zugeordnet [112].

Die C-Termini der *PaBPhy*-PCD bestehen aus den Helizes PHY-hEs [35] (vgl. Abbildung 9A). Die effektorische Histidinkinase (HK) teilt 26% Sequenzidentität (Aminosäurereste) mit dem HK-Modul von *Thermogata maritima* HK0853, wobei die N-Termini dieser parallelen und dimeren HK-Domänen ebenfalls α -Helizes sind [113]. Die Sekundärstruktur-Vorhersage der Linkersequenz zwischen PCD und HK untermauert einen helikalen Linker; dieser geht C-terminal aus der Helix PHY-hE, N-terminal aus der DHp-Domäne hervor [35]. Der helikale Linker ist ein weit verbreite-

tes Motiv der Signaltransduktion über längere molekulare Strecken in homodimeren Signalproteinen. Zum Beispiel vermittelt die Signalhelix (S-Helix) Konformationsänderungen von Sensor- zu Effektormodulen über eine Länge von bis zu 40 Aminosäureresten (\cong 12 Helixwindungen) [114,115].

Kryo-Elektronenmikroskopie (*cryo-EM*) von DrBPhy zeigte, dass sich an die ausge dehnte starre Dimer-Grenzfläche der N-terminalen PCD eine C-terminale flexiblere HK-Domäne anschließt [95]. Dabei sind die Dimer-Grenzflächen für den Signalübertragungsprozess von PCD zu Effektor vermutlich essentiell [15,116]. Den Großteil der Dimer-Grenzfläche bilden dabei die α -helikalen Bündel der GAF-Domäne und HK-Effektordomäne [35,95]. Die Änderungen der Tertiär- und Quartärstruktur an der Dimer-Grenzfläche des Helixbündels orientieren den Histidinrest in der Phosphoakzeptor (DHP)-Domäne hinsichtlich der katalytischen Domäne vermutlich so, dass die Phosphorylierung in *trans* erfolgt [35].

1.3 Optogenetik

Die Schaltbarkeit von biologischen Effektoren in Photorezeptoren wird in der Optogenetik nutzbar gemacht. Die genetische Kodierung von Photorezeptoren ermöglicht die Perturbation von Signalprozessen in lebenden Zellen und Organismen durch Licht. Die optogenetische Manipulation ist reversibel, nicht-invasiv und räumlich-zeitlich hoch aufgelöst [117]. Die räumlich-zeitliche Genauigkeit wird auf der einen Seite optisch durch Parameter wie Intensität, Puls-Frequenz und Fokussierung des Lichts erzielt, wie z.B. durch Verwendung eines fokalen Lasers [118]. Auf der anderen Seite lässt sich genetisch durch stabile Transfektion von Photorezeptor-DNA unter Verwendung zell- und gewebspezifischer Promotoren der optogenetische Aktuator im Modellorganismus zellulär lokalisieren [119]. Beispielsweise wurde das mikrobielle Kanalrhodopsin-2 (ChR2), ein lichtaktivierter Kationenkanal aus der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* [120], spezifisch in mechanosensorischen Neuronen von *Caenorabditis elegans* exprimiert (Abbildung 10). Die im Wildtyp durch Berührung ausgelöste und durch mechanosensorische Rezeptoren (Nozizeption) vermittelte Änderung der Bewegungsrichtung des Nematoden wird nun durch blaulichtadaptiertes ChR2 ausgelöst, das die mechanosensorischen Neuronen durch Kanalöffnung lichtabhängig depolarisiert [121].

Ferner begründete ChR2 die Optogenetik in Wirbeltieren [122]. ChR2-exprimierende Neuronen aus dem Ratten-Hippocampus zeigten in Zellkultur Aktionspotentiale, die durch Photoströme induziert wurden [123]. Mittlerweile werden Photorezeptoren für die optogenetische Anwendung subzellulär lokalisiert, wie die Fusion von LOVpep (*Avena sativa* Phototropin-LOV2 + J α -Helix mit PDZ-Erkennungspeptid) mit PEX3, einem Signalpeptid für Peroxisomen, verdeutlicht [124]. Unter Blaulicht wird die J α -Helix von AsLOV2 entfaltet und gibt das verborgene PDZ-Erkennungspeptid frei [125]. Dieses interagiert wiederum mit einer PDZ-Domäne (*post synaptic density 95*, *discs large 1*, *zonula occludens-1 proteins*), die mit dem Motorprotein Kinesin fusioniert ist. Die lichtabhängige Interaktion moduliert so Transport und Positionierung des Organells [124].

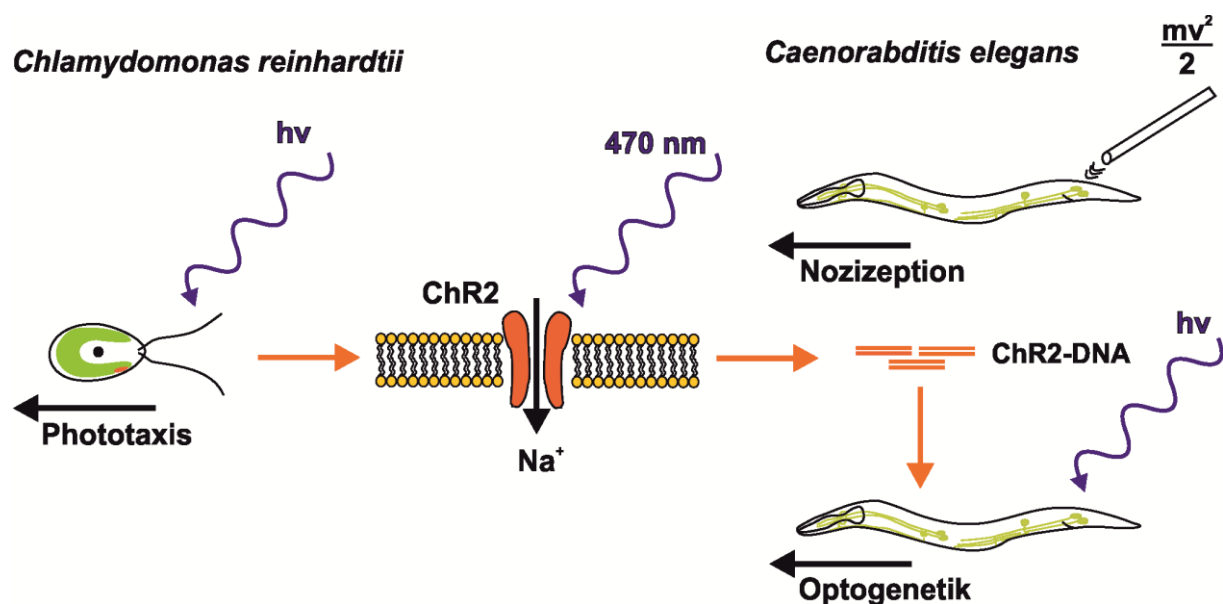


Abbildung 10. Optogenetik. Kanalrhodopsin-2 (ChR2) aus *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein blaulichtaktivierter Kationenkanal, der im Augenfleck der einzelligen Grünalge lokalisiert ist und Phototaxis induziert [120] (Mitte links). Der mit dem ChR2-Gen stabil transfizierte Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, exprimiert den Ionenkanal über einen gewebspezifischen Promotor in mechanosensorischen Neuronen heterolog [121]. Im Wildtyp-Nematoden wird über mechanische Reizung dieser Neuronen ein Fluchtreflex ausgelöst (oben rechts) (Nozizeption). Dieser wird im ChR2-Stamm über Bestrahlung mit Blaulicht ($h\nu$; 470 nm) ausgelöst. Grund ist die lichtinduzierte Depolarisation der mechanosensorischen Neuronen [121].

Von speziellem Interesse ist die optogenetische Kontrolle von *Second-messenger*-Spiegeln, wie z.B. von cAMP und cGMP. Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration durch lichtaktivierte Adenylzyklasen ist mittlerweile ein etabliertes

optogenetisches Verfahren. Die mikrobiellen blaulichtaktivierten Adenylylzyklasen (*photoactivated adenylate cyclases*) euPAC [126], bPAC [127,128] sowie eingeschränkt mPAC [129] wurden genutzt, um cAMP aus ATP in eukaryotischen Systemen durch Bestrahlung mit Blaulicht zu synthetisieren. bPAC aus dem Bodenbakterium *Beggiatoa* sp. erhöht die cAMP-Konzentration in spezifischen Geweben von *Drosophila*, Toxoplasmodien und Zebrafisch und ermöglicht damit die optogenetische Analyse von cAMP-induziertem Verhalten, Infektionszyklus bzw. Stress [127,130,131]. bPAC gehört zu den BLUF-Rezeptoren mit Flavinadenindinukleotid-(FAD)-Chromophor und besitzt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} \sim 450$ nm [127,128]. Die Effektdomäne besteht aus einer Klasse-III-Adenylylzyklase, wobei die ATP-Substratbindungstasche und das katalytische Zentrum von der Dimer-Grenzfläche der Effektdomäne ausgebildet werden [127]. In *E. coli* und Oozyten aus *Xenopus laevis* wird die Zyklisierung von ATP zu cAMP mit einem Faktor von ~ 300 durch Licht aktiviert [127]. Ein natürlicher Photorezeptor, der die komplementäre lichtaktivierte Degradation von cAMP zu AMP und von cGMP zu GMP katalysiert, ist bisher nicht beschrieben worden.

1.4 Synthetische Photorezeptoren

Natürliche Photorezeptoren lassen sich durch rationale oder zufällige Mutagenese an die entsprechende optogenetische Anwendung anpassen. Zum Beispiel wurde durch ortsspezifische Mutagenese von ChR2 und durch Chimären verschiedener ChR-Spezies das Repertoire zur neuronalen Kontrolle durch Lichtpulse erweitert. Dazu gehören die Veränderung der Ionenselektivität [132,133], die Beschleunigung der Ausschalt-Kinetik [134] sowie die Verschiebung des Aktionsspektrums in den roten Spektralbereich [135]. Auch die blaulichtaktivierte Adenylylzyklase BlaC (*bacterial light-activated adenyl cyclase*; \triangleq bPAC) wurde durch den Austausch von drei einzelnen Aminosäureresten in der Substratbindungstasche des Zyklase-Effektors in die Guanylylzyklase BlgC (*bacterial light-activated guanylyl cyclase*) umgewandelt. BlgC zyklisiert lichtabhängig GTP zu cGMP, wenn auch mit einer erheblichen Minderrung des Substratumsatzes und unter Konservierung einer Adenylylzyklase-Restaktivität [128].

Photorezeptoren mit optogenetisch relevanten Eigenschaften wurden nicht nur durch Mutagenese von natürlichen Proteinen, sondern auch durch Neukombination als synthetische Photorezeptoren generiert. Die Fusion von Photosensor- und Effektmolekülen aus unterschiedlichen Photo- bzw. Signalrezeptoren ergab lichtregulierte Chimären mit entsprechenden photochemischen bzw. enzymatischen Eigenschaften [136]. Rationale strukturbasierte Fusionsstrategien haben funktionale synthetische Photorezeptoren hervorgebracht, z.B. die lichtreprimierte Histidinkinase YF1 [137] und die lichtaktivierte GTPase PA-Rac1 (*photoactivated* Rac1) [138]. Letztere zeitigt die lichtabhängige Migration von HeLa-Zellen durch Regulation der Zytoskelett-Dynamik [139]. Die neuartige Kopplung von Effektoren an Photosensoren ermöglicht somit die gezielte Kontrolle spezifischer biologischer Prozesse, die durch die Bandbreite natürlicher Photorezeptoren nicht abgedeckt wurden.

Mehrere Photorezeptorklassen sind für synthetische Photorezeptoren verwendet worden. Ein Vertreter der synthetischen Blaulichtrezeptoren ist beispielsweise die bereits erwähnte PA-Rac1. Diese stellt eine Fusion aus der LOV2-Domäne von *Avena sativa* Phototropin 1 (AsLOV2) und der GTPase Rac1 dar, die über die sogenannte J α -Helix verbunden sind [139]. Unter Blaulichtbestrahlung wird die J α -Helix entfaltet und eine sterische Blockade von Rac1 aufgehoben. So kann diese mit nachgeschalteten Signalproteinen, z.B. Rhos, interagieren, die letztendlich das Zytoskelett modulieren [139]. Eine andere Gruppe von synthetischen Blaulichtrezeptoren basiert auf dem lichtabhängig dimerisierenden System Cryptochrom 2 (CRY2)/CIB1 (*cryptochrome-interacting basic helix-loop-helix 1*) aus *Arabidopsis thaliana* [140]. Das System wurde u.a. in eukaryotischen Zellen verwendet, um zwei komplementäre Split-Protein-Fragmente unter Blaulicht zu vereinigen, die zuvor auf zwei Fusionsproteine verteilt worden waren. So wurde beispielsweise die funktionale Aktivität von Split-Gal4 (Gal4BD + Gal4AD), eines transkriptionellen Aktivators, in Hefe wiederhergestellt und so die Expression eines Reportergens über den entsprechenden Promotor optogenetisch kontrolliert [141]. Mit einem analogen Ansatz wurden CRY2-mCherry-Konstrukte optogenetisch an die Plasmamembran von HEK293T-Zellen dirigiert. Unter Blaulicht interagierten diese mit CIBN-GFP-Konstrukten (CIBN = CIB1 Δ 1-170), die bereits an der Plasmamembran lokalisiert waren [141]. Die Klasse der Phytochrom-basierten synthetischen Rotlichtrezeptoren wird weiter unten eingeführt (s. Abschnitt 1.4.1).

PA-Rac1 zeigt, dass sich evolutionär und mechanistisch weit auseinanderliegende bzw. verschiedenartige Photosensoren und Effektoren funktional kombinieren lassen [136]. Synthetische Photorezeptoren lassen sich nach dem Signaltransduktionsmechanismus grob in zwei Gruppen einteilen: I. durch Assoziation/Dissoziation und II. nicht durch Assoziation/Dissoziation regulierte synthetische Photorezeptoren [142] (Abbildung 11). Gruppe I fasst die Photorezeptoren zusammen, die lichtabhängig mono-, di- oder oligomerisieren. Der Oligomerisierungsgrad bestimmt damit auch die Aktivität des Effektor-Moduls. Gruppe II beinhaltet unter anderen AsLOV2-basierte Photorezeptoren, wie z.B. PA-Rac1, deren Effektor-Aktivität von der lichtinduzierten Entfaltung der J α -Helix abhängt [138]. Zum anderen gehören zu Gruppe-II-Photorezeptoren solche, die die intramolekulare Übertragung der Konformationsänderung der Vorläuferproteine zwischen Sensor und Effektor konservieren, was z.B. für die lichtreprimierte Histidinkinase YF1 gilt. Unter Blaulicht wird die Phosphorylierung des YF1-Response-Regulators *Bradyrhizobium japonicum* FixJ mehr als 1000-fach reduziert [137]. YF1 besteht N-terminal aus der LOV-Domäne von *Bacillus subtilis* YtvA und C-terminal aus der Histidinkinase (HK) von *Bradyrhizobium japonicum* FixL. Die Linkersequenz zwischen LOV und HK ist im YF1-Dimer ein paralleles Coiled-Coil [143]. Coiled-Coil-Helizes zeigen ein wiederkehrendes Sequenzmotiv von sieben Aminosäureresten (Heptade), wobei der erste und vierte Aminosäurerest hydrophob ist [144]. Das enzymatische Aktivitätsmuster der HK war abhängig von der Länge der Linkerhelix und zeigte eine Heptadenperiodizität [137]. Die YF1-Struktur offenbarte keine lateralen nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen LOV und HK, und die Signaltransduktion erfolgte wie beim Vorläuferprotein BjFixL vermutlich nur über den Coiled-Coil von N- nach C-Terminus [143]. Neben Entfaltung wurde als Mechanismus der Signaltransduktion ein Drehmoment am konservierten Coiled-Coil postuliert [15,143].

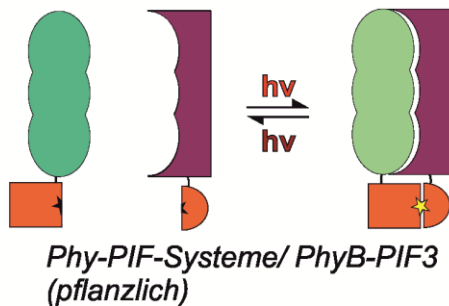
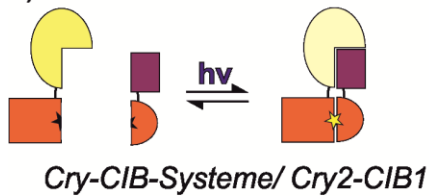
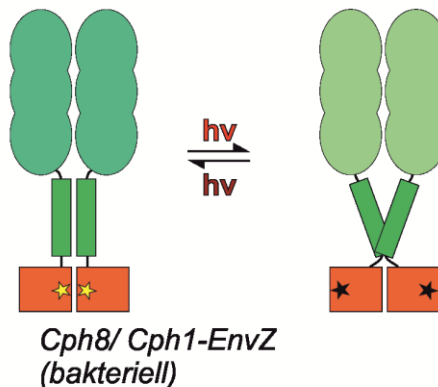
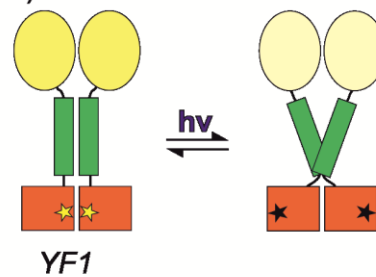
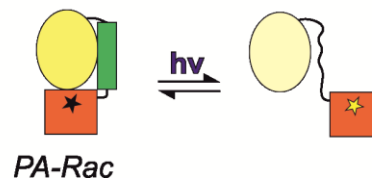
I. Assoziation/Dissoziation**a) Proteininteraktion****b) Split-Protein****c) Sequestrierung****II. Keine Assoziation/Dissoziation****a) Austausch von Sensor- und Effektormodulen****b) AsLOV-J α -Helix-basierte Systeme**

Abbildung 11. Schematische Gliederung synthetischer Photorezeptoren. Synthetische Photorezeptoren lassen sich nach ihrem Signaltransduktionsmechanismus in zwei Gruppen einteilen: **I.** Gruppe-I-Photorezeptoren modulieren die Aktivität ihrer Effektor-Module (orange) über lichtabhängige Assoziation/Dissoziation der Photosensor-Domänen. Über diesen Mechanismus werden Proteininteraktionen (a), Split-Protein-Systeme (b) und Sequestrierung (c) reguliert. Dazu gehören die Cry2-CIB1 (gelb-violett)- und die PhyB-PIF3 (grün-violett)-basierten Photorezeptoren. **II.** Gruppe-II-Photorezeptoren werden *nicht* über Assoziation/Dissoziation reguliert. Diese umfassen synthetische Photorezeptoren, (a) die aus dem Austausch strukturell homologer Sensordomänen, wie z.B. LOV (gelb) in YF1 und PCD (grün) in Cph8, hervorgegangen sind, (b) deren Konstruktion auf der AsLOV-Domäne basiert. Viele Gruppe-II-Photorezeptoren tragen Linkerhelizes (grün) zwischen Sensor- und Effektormodulen. Die schematische Darstellung der synthetischen Photorezeptoren basiert auf [15].

1.4.1 Phytochrom-basierte synthetische Photorezeptoren

Von Vorteil für optogenetische Anwendungen in Säugergewebe sind Photorezeptoren, die sich durch nahes Infrarotlicht (650-900 nm) aktivieren lassen. In diesem Spektralbereich ist die Absorption von Hämoglobin, Melanin und Wasser niedrig sowie die Lichtstreuung bei größerer Wellenlänge gering [145]. Zum einen ermöglicht die tiefe Durchdringung von Gewebe durch nahes Infrarotlicht im Tiermodell eine

nicht-invasive Optogenetik ohne operativen Eingriff; zum anderen wird bei geringerer Strahlungsenergie ($E^\circ = h\nu$) die Phototoxizität verringert [21].

Natürliche und abgeleitete mikrobielle Rhodopsine sind als optogenetische Aktuatoren durch Absorptionsmaxima charakterisiert, die vom UV-Bereich bis zu einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} \sim 630$ nm reichen [146]. Phytochrom-basierte synthetische Photorezeptoren decken hingegen den sichtbaren, nahen Infrarot-Bereich vollständig ab [21].

Das erste synthetische Phytochrom basierte auf pflanzlichem PhyB und kontrollierte lichtinduzierte Genexpression in Eukaryoten (Hefe) [147]. Optogenetische Aktuatoren waren zwei chimäre Proteine aus Gruppe I: zum einen die Fusion aus PhyB und der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (Phy-GBD), zum anderen eine Fusion aus PIF3 und der GAL4-Aktivierungsdomäne (PIF3-GAD) (Abbildung 11). Phy-GBD liegt im dunkeladaptierten Zustand vorwiegend in der P_r -Form vor und bindet in einem synthetischen Operon an die Promotorregion Gal1-UAS (*upstream activating sequence*). Unter Bestrahlung mit Rotlicht bindet Phy-GBD im P_r/P_{fr} -Zustand PIF3 und dirigiert somit GAD an den Transkriptionsstart. Bestrahlung mit FR-Licht führt zur Dissoziation des Phy-GBD:PIF3-GAD-Heterodimers und unterbindet die Initiation der Transkription. Das Ergebnis war die schaltbare Kontrolle eines Reportergens (hier: HIS oder LacZ) [147]. Ein analoges System beruht auf der lichtabhängigen Interaktion von PhyB mit PIF6. Durch Rekrutierung des Rac (Rho-ähnliche GTPase)-Aktivators Tiam an die Zellmembran von kultivierten Säugerzellen wird die lokale Ausbildung von Lamellipodien im Lichtfeld kontrolliert [148]. Auf der Dimerisierung von PhyB mit PIFs basieren weitere optogenetische Aktuatoren: Die Aktivierung durch WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*) durch die GTPase Cdc42 wurde entsprechend durch PhyB-PIF3-Interaktion vermittelt und ermöglichte einen lichtregulierten Aktinaufbau in Zellen [149]. Eine lichtinduzierte Spleißreaktion auf Proteinebene wurde durch ein ATPase-Intein-Splitsystem ermöglicht, das mit PhyB und PIF3 fusioniert wurde [150].

Die wasserlöslichen Bakteriophytochrome mit Biliverdin-Chromophor zeigen von allen Photorezeptorklassen die stärkste Rotverschiebung (z.B. *Rhodobacter sphaeroides* BphG1; $\lambda_{\max}(P_r) = 712$ nm; $\lambda_{\max}(P_{fr}) = 756$ nm) [151]. Durch ihre ausgeprägte Modularität zeichnen sie sich besonders für die Konstruktion von Photorezeptoren aus [15]. Ein synthetisches Phytochrom aus Gruppe II ist die

rotlichtreprimierte Histidinkinase Cph8, die in einem Zweikomponentensystem die Genexpression in *E. coli* modulierte [152]. Das *Synechocystis* sp. Cph1-PCD-Modul ersetzte hier die osmosensitive N-terminale HAMP-Domäne (*histidine kinases, adenylate cyclases, methyl-accepting proteins and phosphatases*) der EnvZ-Histidinkinase. Im rotlichtadaptierten P_r/P_{fr} -Mischzustand wird die Phosphorylierung des EnvZ-Response-Regulators (RR) OmpR unterdrückt. Der dephosphorylierte RR bindet an den entsprechenden *ompC*-Promotor und reprimiert die Expression eines nachgeschalteten LacZ-Reporters [152].

Bakteriophytochrom-basierte synthetische Photorezeptoren blieben bisher auf Cph8 beschränkt. Dagegen wurde die PCD bzw. CBD von Bakteriophytochromen mehrfach zur Konstruktion von rot fluoreszierenden Proteinen, wie IFP (*infrared-fluorescent protein*) und iRFP (*infra-red fluorescent protein*), sowie von Biosensoren verwendet [21]. Die Fluoreszenzreporter wurden zunächst mit pflanzlichen und cyanobakteriellen, d.h. PCB-tragenden, Phytochromen realisiert und waren daher auf Exzitations-/Emissionsspektren von 660/680 nm limitiert [153–156]. Im Gegensatz dazu wurden Fluoreszenzreporter des nahen IR-Bereichs (690-760 nm) ausgehend von proteobakteriellen Bakteriophytochromen mit BV entwickelt. Das infrarot-fluoreszierende Protein IFP1.4 besteht aus dem DrBPhy-PAS-GAF-Tandem ohne PHY-Domäne und basiert auf der fluoreszierenden DrBPhy-CBD-D207H-Mutante [157] (vgl. Abschnitt 1.2.10). IFP wurde durch mehrere Mutationszyklen in der Fluoreszenzquantenausbeute gesteigert und für die Anwendung als molekularer Fluoreszenzreporter monomerisiert; in HEK-Zellen und im Mausmodell (Leber) war IFP1.4 funktional [157]. Als fluoreszente Biosensoren wurden Bakteriophytochrome bisher ausschließlich für die intrazelluläre Detektion von Hg(II)-Ionen generiert. Zweiwertige Hg-Ionen konkurrieren mit BV in IFP um die Bindungsstelle am Cysteinrest (C24). Die Anwesenheit von Hg-Ionen wird über die sinkende Fluoreszenzintensität bis unter 50 nM detektiert [158].

1.4.2 Bioverfügbarkeit von linearen Tetrapyrrol-Chromophoren

Die Verwendung von natürlich vorkommenden Retinal- und Flavin-Chromophoren in ChR2 bzw. bPAC ermöglicht eine rein optogenetische Kodierung in mikrobiellen und tierischen Modellen ohne Zugabe des Kofaktors [136] (s. Abschnitt 1.4).

In tierischen Modellorganismen werden die Chromophore PCB und PΦB aus den cyanobakteriellen bzw. pflanzlichen Phytochromen natürlicherweise nicht synthetisiert [21]. Gleichzeitig wird cyanobakterielles PCB aber von pflanzlichen

Phytochromen inkorporiert und durchläuft einen intakten Photozyklus [159]. Cph1- und PhyB-basierte synthetische Photorezeptoren funktionieren mit PCB als Chromophor [21]. Zum einen kann PCB durch Anreicherung im Expressionsmedium der tierischen Zellkultur bereitgestellt werden, wie im Fall des PhyB-regulierten Rac-Aktivators Tiam [148]. Zum anderen werden in der entsprechenden Säugerzelle die Oxidoreduktasen Hämoxygenase 1 (HO1) und Phycocyanobilin:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PcyA) aus dem Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus* heterolog koexprimiert [160]; HO1 spaltet Häm zu BV, das wiederum von PcyA zu PCB umgesetzt wird.

Durch Verwendung von Bakteriophytochrom-PCDs mit Biliverdin könnte die Rekonstitution von Holo-Photorezeptor für die optogenetische Anwendung verbessert werden. BV ist nämlich ein endogenes Degradationsprodukt von Häm in Eukaryoten [7]; es ist im Säugergewebe daher ubiquitär und in submikromolaren Konzentrationen vorhanden [157]. Durch die Sequestrierung von BV aus dem Häm-Katabolismus ist IFP ohne Zusatz von Biliverdin in eukaryotischer Zellkultur und in der Mäuseleber fluoreszent, wo die Konzentration von katabolem BV lokal erhöht ist. Somit ist mit Bakteriophytochromen eine echte optogenetische Kodierung möglich, da der Chromophor nicht exogen zugesetzt werden muss. Allerdings war es nötig, die Fluoreszenz durch Rekonstitution von Holo-IFP über Anreicherung bzw. Injektion von exogenem BV im Expressionsmedium bzw. im Mausmodell zu erhöhen [157].

1.5 Zyklisches-Nukleotid-spezifische Phosphodiesterasen

1.5.1 Die Botenstoffe cAMP und cGMP

Als Botenstoffe (*second messenger*) werden zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) signalabhängig gebildet und vermitteln die sekundäre Signalübertragung und -amplifikation in Zellen [161] (Abbildung 12A). cAMP ist in Prokaryoten und Eukaryoten ubiquitär [162], cGMP wurde hingegen eukaryotischen Systemen zugeordnet. Letzteres ist jedoch auch in den Bakterien *Rhodospirillum centenum* und *Xanthomonas campestris* als endogenes Signalmolekül beschrieben worden [163,164]. Synthese und Degradation von zyklischen Nukleosidmonophosphaten (cNMPs) werden von cNMP-Zyklasten bzw. -Phosphodiesterasen (PDEs) katalysiert; diese setzen cAMP und cGMP selektiv oder dual um [165]. Diverse cAMP- und cGMP-vermittelte Signalprozesse werden somit von Zyklasten und Phosphodiesterasen reguliert und umfassen Apoptose, Relaxation der glatten Muskulatur, den Sehvorgang und die Geruchswahrnehmung [165–168]. In eukaryotischen Zellen beispielsweise aktiviert der β -adrenerge Rezeptor, ein GPCR, die membranständige Adenylylzyklase (AZ) über Interaktion mit stimulatorischem G-Protein (G_s). Das gebildete cAMP aktiviert wiederum die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) [169], die spezifische Signalproteine phosphoryliert. Diese vermitteln eine metabolische Kurzzeit- oder Langzeitantwort der Genexpression, z.B. über Phosphorylierung der Protein-Phosphatase 1 (PP1) [170] bzw. von CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*) [169]. In tubulären Nierenzellen stimuliert das atriale natriuretische Peptid (ANP) die membranständige Guanylylzyklase (GZ; \triangleq ANP-Rezeptor). Durch Erhöhung der lokalen cGMP-Konzentration an der Membran werden durch intrazelluläre cGMP-Bindung Na^+ -leitende CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide-gated channels*) geschlossen. Somit wird die Natriumresorption herabgesenkt und die Harnausscheidung erhöht [171]. In Venen und Arterien vermitteln lösliche, durch Stickstoffmonoxid (NO) stimulierte GZs die Vasodilatation [172].

Die intrazelluläre *Steady-state*-Konzentration von cAMP und cGMP wird durch die Netto-Aktivität von Zyklasten und Phosphodiesterasen bestimmt; durch deren subzelluläre Lokalisation sind *second messenger* auch räumlich streng reguliert [165]. In Herzmuskelzellen beispielsweise wird der cAMP-Spiegel einerseits durch die G_s -abhängige AZ (s.o.) und andererseits durch die cAMP-selektive PDE4 regu-

liert. Das muskuläre AKAP (*A-kinase anchoring protein*) lokalisiert dabei PDE4 in subzellulären Kompartimenten [173].

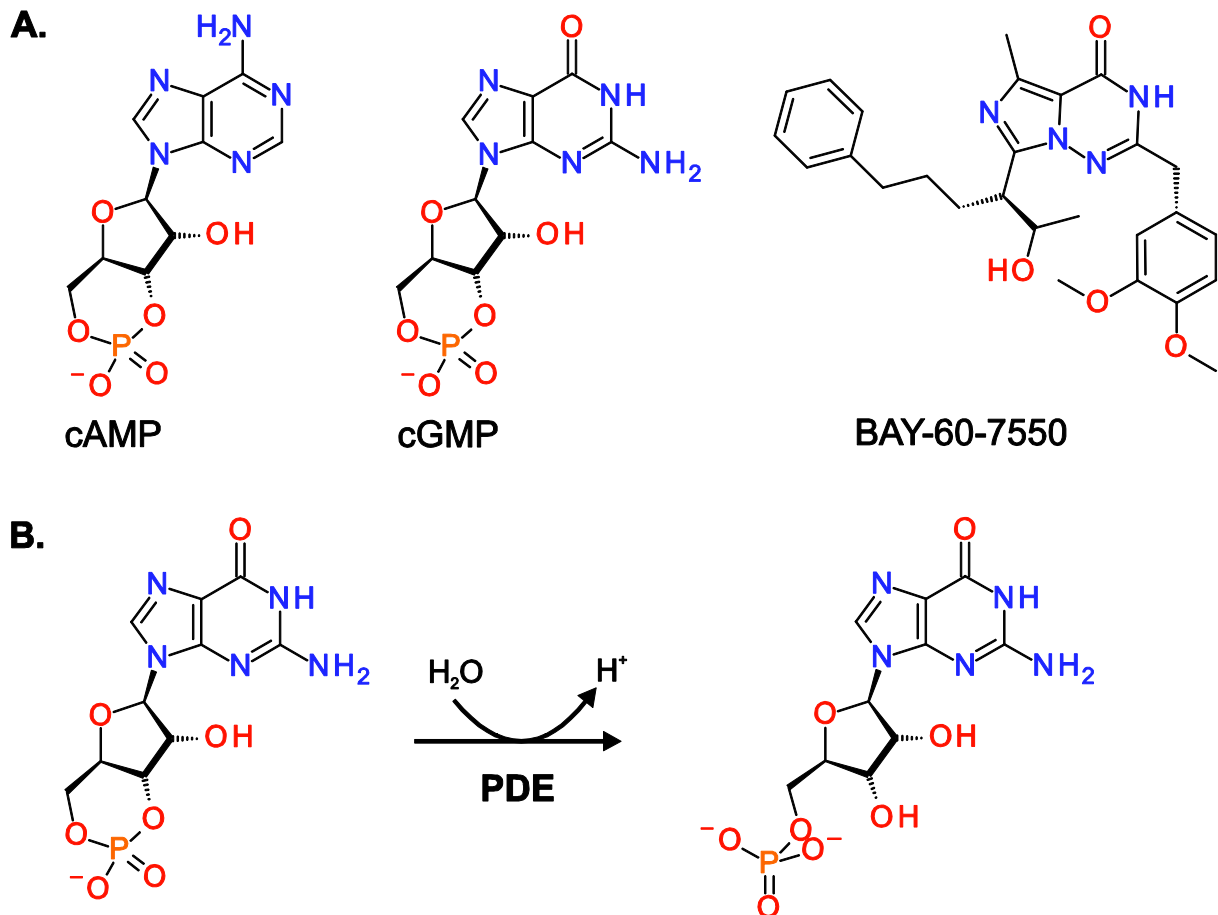


Abbildung 12. Zyklische Nukleotide (cNMPs), PDE2-Inhibitor, Hydrolyse von cGMP. A. Dargestellt sind die Strukturformeln von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP, links), zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP, Mitte), PDE2A-spezifischem Inhibitor BAY-60-7550 (rechts). **B.** Phosphodiesterasen katalysieren die Hydrolyse-Reaktion von cNMP zu NMP unter Eintritt eines Wassermoleküls und Abgabe eines Protons (hier: cGMP zu GMP) [167].

1.5.2 Die Phosphodiesterase-Superfamilie in Säugern

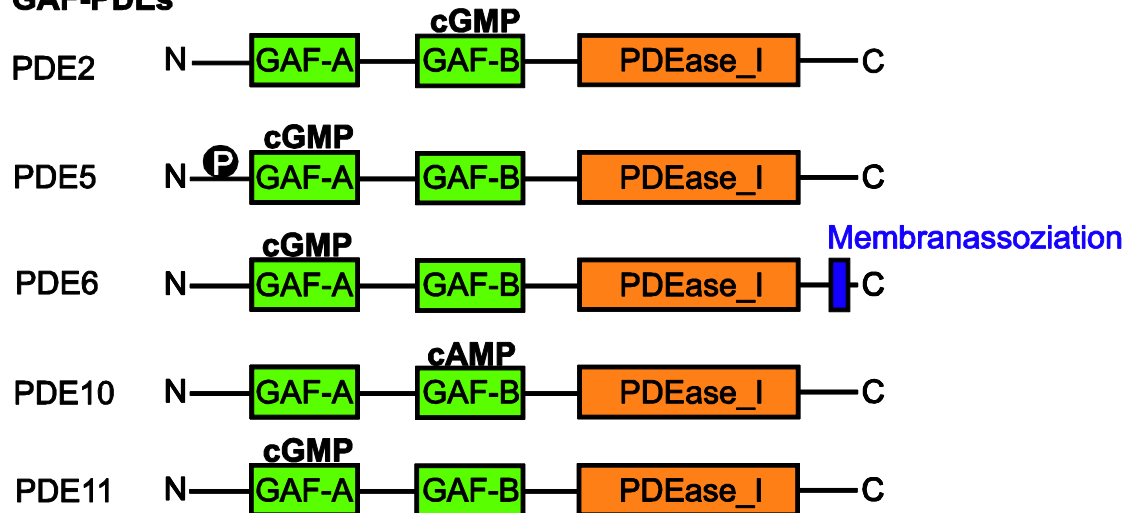
PDEs katalysieren die Spaltung der 3'-Phosphatbindung von cAMP und cGMP unter Bildung von AMP bzw. GMP sowie unter Eintritt eines Wassermoleküls und Abgabe eines Protons [167] (Abbildung 12B). cNMP-spezifische PDEs kommen in Bakterien, Hefen, einzelligen Schleimpilzen (*Dictyostelium*), Metazoen und Protisten, wie den Choanoflagellaten, vor [165]. Die Superfamilie der Säuger-PDEs umfasst elf Familien, von denen jede durch alternatives Spleißen und multiple Promotoren mehrere Isoformen ausbildet [165] (Abbildung 13A). Neben den erwähnten Signalprozessen

sind PDEs in zahlreichen cNMP-abhängigen physiologischen Prozessen involviert, wozu synaptische Funktion, Immunreaktion und Blutstillung (Hämostase) gehören [167]. Defekte PDEs sind die molekulare Ursache für Erkrankungen wie Asthma, Autoimmunreaktion, Bluthochdruck, Schizophrenie, Nachtblindheit und erektile Dysfunktion. Viele dieser Krankheitsbilder wurden erfolgreich mit PDE-Inhibitoren behandelt [167].

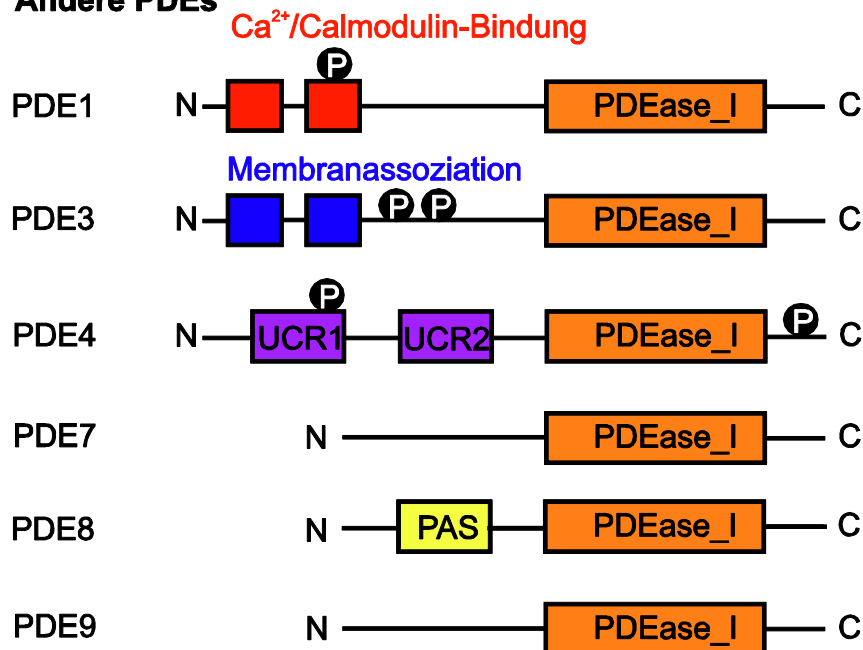
Hinsichtlich ihrer Substratspezifität lassen sich Säuger-PDEs in cAMP-spezifische (4, 7 und 8) und cGMP-spezifische PDEs (5, 6, 9) unterteilen. PDE1, 2, 3, 10 und 11 besitzen eine duale Spezifität für beide cNMPs [167] (Abbildung 13B). PDE-Isoformen und -Familien unterscheiden sich quantitativ in ihrer Substrataffinität (K_M) und Maximalgeschwindigkeit (v_{max}). Die höchste katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) besitzt rPDE6 in Stäbchenzellen (*rod*) des Wirbeltierauges. Mit $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ läuft die cGMP-Hydrolyse nahezu diffusionskontrolliert ab [174]. PDE9 mit hoher Affinität zu cGMP hat mit ~70-170 nM den niedrigsten K_M -Wert [175].

In Stäbchen- (*rod*) und Zäpfchenzellen (*cone cells*) vermitteln die membranständigen Isoformen rPDE6 bzw. cPDE6 die Sehkaskade [176]. In dunkeladaptierten Stäbchenzellen herrscht aufgrund der Aktivität der membranständigen Retinal-Guanylylzyklase (RETGC) ein hoher cGMP-Spiegel vor. Visuelle CNG-Kanäle B1 (*c*y*c*l*i**c* *n*u*c*l*e**o**t**i**d**e*-*g**a**t**e**d* *c**h**a**n**n**e**l**s*) sind durch cGMP-Bindung dauerhaft geöffnet. Über Na^+ -Einstrom wird so in der Zelle ein dauerhaft niedriges Ruhepotential aufrechterhalten. Bei Absorption eines Photons setzt der GPCR (*G* *p**r**o**t**e**i**n*-*c**o**u**p**l**e**d* *r**e**c**e**p**t**o**r*) Rhodopsin das G_i -Protein Transduzin frei, und dessen α -Untereinheit (α -UE) interagiert mit der γ -UE der trimeren PDE6 (α -, β -, γ -UE) und aktiviert diese. Infolgedessen sinkt die lokale cGMP-Konzentration an der scheibenförmigen Stäbchenmembran, wodurch die CNG-Kanäle (*c*y*c*l*i**c* *n*u*c*l*e**o**t**i**d**e*-*g**a**t**e**d*) geschlossen und die Stäbchenzellen hyperpolarisiert werden. Die lichtabhängige Hyperpolarisation der Sehzellen induziert die neuronale Reizweiterleitung [176]. Lösliche PDE5 ist in glatten Muskelzellen der Gegenspieler zur NO-abhängigen Guanylylzyklase; diese inhibiert durch cGMP-Degradation die Relaxation [167] (s. Abschnitt 1.5.1).

A GAF-PDEs



Andere PDEs



B PDE-Selektivität

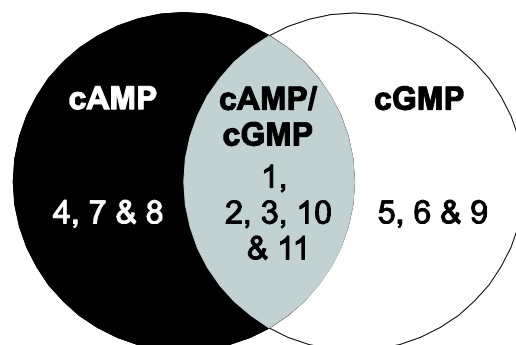


Abbildung 13. Domänenarchitektur und cNMP-Selektivität der Säuger-PDE-Superfamilie. A. Säuger-PDEs lassen sich nach ihrer Domänenarchitektur in elf Familien unterteilen: Alle Säuger-PDEs

tragen eine konservierte C-terminale katalytische PDEase_I-Domäne (Pfam-Datenbank-Annotation: PF00233) (orange). In PDEs mit GAF-A—GAF-B-Tandem (grün) können eine oder beide GAF-Domänen an Dimerkontakten partizipieren. Eine der beiden GAF-Domänen bindet entweder cGMP (PDE2, PDE5, PDE6, PDE11) oder cAMP (PDE10), und die Aktivität der katalytischen Domäne (PDE2, PDE5, PDE6) wird so allosterisch reguliert. Einige PDEs tragen Phosphorylierungsstellen (P). Andere PDE-Familien haben einzigartige regulatorische Domänentandems (UCR, NHR, PAS, Ca²⁺/Calmodulin-Bindung, Membranassoziation) zur Enzymregulation. **B.** Säuger-PDE-Familien lassen sich nach ihrer Spezifität gegenüber cAMP und cGMP in drei Gruppen einteilen: Duale spezifische PDEs (graue Fläche) hydrolysieren sowohl cAMP als auch cGMP, mit vergleichbarer oder unterschiedlicher Affinität (K_M) und Maximalgeschwindigkeit (v_{max}). cAMP- und cGMP-spezifische PDEs (schwarze bzw. weiße Fläche) sind durch eine starke Spezifität für cAMP bzw. cGMP als Substrat gekennzeichnet. PDE-Architekturen und Schemata der PDE-Spezifität basieren auf [167].

1.5.3 Struktur, Katalyse und cNMP-Bindung der katalytischen Domäne von Säuger-Phosphodiesterasen (PDEs)

Säuger-PDEs gehören zur Klasse PDE I (Pfam-Annotation: PDEase_I), deren C-terminale katalytische Domäne innerhalb der PDE-Superfamilie konserviert ist (Abbildung 13A). Die PDE-Domäne ist durch das AS-Sequenzmotiv H(X)₃H(X)₂₅₋₃₅(D/E) definiert, das für Metallhydrolasen charakteristisch ist [177]. PDE-I-Domänen besitzen 17 invariante Aminosäurereste, von denen die meisten im aktiven Zentrum und der Substratbindungstasche lokalisiert sind, und sind durch eine konservierte globuläre Topologie charakterisiert [178,179] (Abbildung 14A). Ein Netzwerk aus 15-17 α -Helizes [180] wird strukturell in eine cNMP-Purin-interagierende und eine Histidin-reiche, Metall-bindende Region unterteilt [178].

1.5.4 Spezifität von Phosphodiesterasen für zyklische Nukleotide

Die Purin-Bindungsstelle bildet eine hydrophobe Tasche aus, wobei eine Seite der Purinring-Ebene in den meisten PDEs von einem konservierten Phenylalaninrest (F729 bei HsPDE10A2) besetzt wird [180] (Abbildung 14B). Die andere Seite wird durch ein hydrophobes Cluster aus aliphatischen und hydrophoben Aminosäureresten gebildet (Abbildung 14B). Phenylalanin und hydrophobes Cluster bilden zusammen eine Klammer um den Purinring des cNMP-Substrats oder NMP-Produkts (Nukleosidmonophosphat) [181]. Im Fall von Sildenafil ist es das aromatische Ringsystem des selektiven PDE5-Inhibitors [182]. Weiter befindet sich in der Purinbindungsstelle ein invariantes Glutamin, das über die O ϵ 1- und N ϵ 2-Gruppe mit dem cNMP-Purin interagiert [181] (Abbildung 14B: Q726). cAMP und cGMP kommen in wässriger, neutraler Lösung jeweils in einem Gleichgewicht aus *syn*- und *anti*-Konformation vor, mit ~30:70 für cAMP und ~95:5 für cGMP [183]. Die *syn/anti*-Konformation bezieht sich auf die Orientierung des zyklischen

Ribosephosphattrings an der N9-glykosidischen Bindung (vgl. Abbildung 14B). Kristallstrukturen von inaktiver cAMP-spezifischer PDE4D2-Mutante, cGMP-spezifischer PDE9 und dual-spezifischer PDE10 deuteten als Enzym-Substrat-Komplex auf die strukturellen Ursachen der Substratspezifität: In PDE4D2 und PDE9 liegen cAMP bzw. cGMP in der *anti*-Konformation vor; in PDE10 sind cAMP und cGMP in *syn*-Stellung [184]. In cGMP- oder cAMP-spezifischen PDEs lässt die Konfiguration der Aminosäurereste jeweils nur eine Bindung in *anti*-Konformation zu [180]. In PDEs mit dualer Spezifität bilden cGMP und cAMP in *syn*-Konformation jeweils verschiedene H-Brückenbindungen aus. Das invariante Glutamin unterhält z.B. zwei H-Brücken zu cAMP, zu cGMP nur eine [180]. Darüber hinaus gibt es bei dualen PDEs Untergruppen von Aminosäureresten, mit denen entweder cAMP oder cGMP oder beide wechselwirken [185].

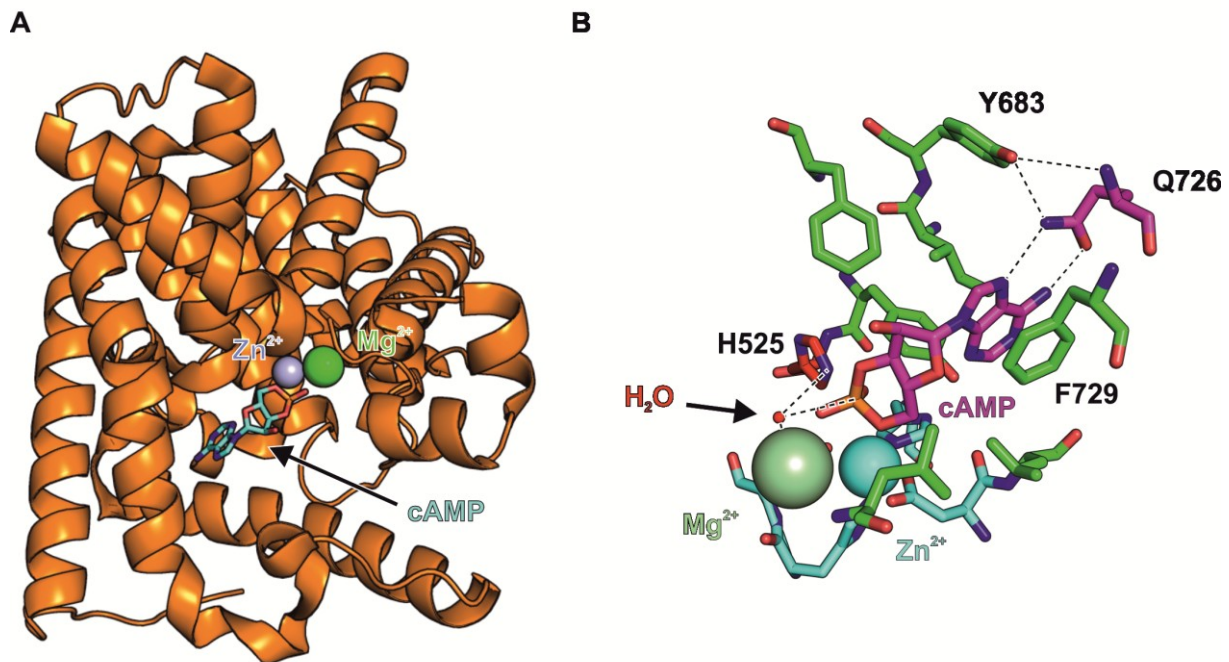


Abbildung 14. Struktur der katalytischen Domäne, des aktiven Zentrums und der Substratbindungstasche von katalytisch inaktiver HsPDE10A2-D564A [180]. A. Untereinheit der PDE-Domäne mit koordiniertem cAMP, Mg²⁺ und Zn²⁺ (PDB-Code: 2OUY). **B.** Aktives Zentrum koordiniert Mg²⁺, Zn²⁺, cAMP-Phosphoestergruppe, katalytisches His-525 und Wasser (links); die Substratbindungstasche bettet cAMP-Purinring u.a. über Tyr-683, Gln-726 und Phe-729 ein (rechts) (PDB-Code: 2OUY) [180].

1.5.5 Hydrolyse von zyklischen Nukleotiden durch Phosphodiesterasen

Ein Modell des Reaktionsmechanismus wurde durch Kristallstrukturen verschiedener PDE-Domänen als Apoprotein und als Enzym-Substrat-Komplex (mit cNMP-Analoga) ermöglicht [186,187]: Das aktive Zentrum koordiniert zwei divalente Metall-Ionen, wie für die katalytischen Domänen von PDE2 [188], PDE4 [189] und PDE10 [180] gezeigt wurde (vgl. Abbildung 14B). Die erste Metallposition (Me-1) wird in allen PDE-Strukturen (mit Ausnahme von PDE3) von einem fest koordinierten Zn^{2+} besetzt [178,179,190]. Stattdessen findet man in der zweiten Metall-Position (Me-2) in sämtlichen Kristallstrukturen Mg^{2+} vor [167]. Die Koordination der Metalle erfolgt durch invariante Histidin- und Aspartatreste der histidinreichen Region [178,179,191], wobei die Zn^{2+} - und Mg^{2+} -Metallpositionen vermutlich von einem OH^- -Ion überbrückt werden [192,193]. Dieses wird durch Polarisierung eines (Kristall-)Wassermoleküls durch die histidinreiche Sequenz und die beiden Metallionen gebildet. Das Hydroxidion ist katalytisch und leitet die alkalische Hydrolyse durch nukleophilen Angriff der zyklischen Phosphorsäureestergruppe ein [186,187] (vgl. Abbildung 12B). Der Abstand von $\sim 4 \text{ \AA}$ zwischen Hydroxidion und zyklischer Phosphatgruppe in PDE10 verweist auf eine Lücke im Verständnis des katalytischen Mechanismus. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der vollständigen Reaktionssequenz ist schließlich die Freisetzung des Produkts 5'-GMP oder 5'-AMP [167].

1.5.6 Struktur der regulatorischen Module von Säuger-Phosphodiesterasen

Im Gegensatz zur hochkonservierten C-terminalen PDE-I-Domäne ist die N-terminale Domänenarchitektur der Säuger-PDE-Superfamilie durch Diversität gekennzeichnet [165] (Abbildung 13A). Die N-terminalen Module haben chemosensorische Funktion, und die Aktivität der PDE-Domäne wird so allosterisch reguliert [167]. Die Ca^{2+} /Calmodulin (CaM)-stimulierte PDE1 trägt ein Ca^{2+} /CaM-bindendes Domänentandem und wird durch Phosphorylierung koreguliert [194]. Die cGMP-inhibierte PDE3 ist über ein NHR-Tandem (*N-terminal hydrophobic region*) membranassoziiert und wird durch die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) phosphoryliert und deaktiviert [195]. Der N-Terminus der cAMP-spezifischen PDE4 ist ein UCR-Tandem (*upstream conserved regulatory*), das ebenfalls regulatorische Phosphorylierungsstellen beinhaltet [196]. Die cAMP-spezifische PDE8 trägt eine vorgeschaltete PAS-Signaldomäne [197]. Im Gegensatz dazu besitzen die PDE-Familien 7 und 9 keine bekannten regulatorischen Domänen [167]. PDE2, 5, 6, 10

und 11 sind allesamt durch ein N-terminales GAF-Domänentandem (GAF-A—GAF-B) charakterisiert [165].

1.5.7 GAF-Tandems in Säuger-Phosphodiesterasen

N-terminale GAF-Tandems in Säuger-PDEs binden mit einer der beiden GAF-Domänen cGMP oder cAMP: GAF-B bindet in PDE2 cGMP und in PDE10 cAMP; in PDE5, 6 und 11 bindet GAF-A cGMP [167] (Abbildung 13A). PDE2, 5 und 6 werden durch cGMP aktiviert; die Aktivität von PDE10 und PDE11 wird durch Bindung von cAMP bzw. cGMP nicht stimuliert [198]. GAF-Domänen regulieren im GAF-A—GAF-B-Tandem auch die cyanobakterielle Adenylzyklase CyaB1 aus *Anabaena*, wobei die CyaB1-Aktivität durch cAMP-Bindung an die GAF-B-Domäne ~25-fach erhöht wird [199]. Das GAF-Tandem der humanen PDE2 ersetzt GAF-A—GAF-B in *Anabaena* CyaB1 funktional, was bedeutet, dass die cAMP-aktivierte CyaB1 in eine cGMP-aktivierte Adenylzyklase umgewandelt wurde. Diese Transformation deutet auf einen konservierten Signaltransduktionsmechanismus, der auf einer konservierten Domänenarchitektur (GAF-A—GAF-B—PDE) beruht [199].

GAF-Domänen in regulatorischen PDE-Tandems bestehen wie in der photosensorischen BPhy-PCD aus einem 6-strängigen, antiparallelen β -Faltblatt, das durch 5 α -Helizes flankiert wird [200] (Abbildung 15A&B). cNMP-bindende GAF-Domänen sind weiter durch ein konserviertes NKDEF-Motiv (Aminosäurereste) charakterisiert [105]. In der gebundenen Form ist das cNMP fast vollständig durch die GAF-Bindungstasche vom Außenmedium abgeschirmt (Abbildung 15B), und die GAF-Domäne nimmt anders als in der ungebundenen Form eine starrere Konformation ein [167]. Eine definierte Topologie ermöglicht die hochselektive Bindung von cAMP oder cGMP. Bei PDE2A-GAF-B beispielsweise beträgt die Dissoziationskonstante $K_D \sim 10\text{--}30\text{ nM}$, wobei die GAF-B-Domäne eine ~30-fach höhere Selektivität für cGMP als für cAMP aufweist [201].

1.5.8 Humane Phosphodiesterase 2A

Humane Phosphodiesterase 2A (*HsPDE2A*) hydrolysiert cGMP und cAMP mit dualer Spezifität [200]. Die PDE-Aktivität wird durch positive Rückkopplung moduliert, wobei eine steigende cGMP-Konzentration zu einer ca. vierfachen Steigerung der Hydrolyse-Aktivität führt [165]. *HsPDE2A* wird hauptsächlich im Gehirn und in geringerem Maß in Herz, Leber, quergestreifter Muskulatur, Niere, Pankreas, Plazenta und

Lunge exprimiert; in diesen Geweben reguliert HsPDE2A die Konzentration von cAMP und cGMP [202].

PDE2A3 ist im Gehirn an der synaptischen Membran lokalisiert und an der Gedächtnisbildung beteiligt [203,204]. Analog zu PDE4 könnte sie die Dopamin-stimulierte Membraninsertion des AMPA-Rezeptors (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure) regulieren, der die synaptische Plastizität moduliert [205]. PDE2A3 und ANP-stimulierte Guanylylzyklase (s. Abschnitt 1.5.1) sind in Myozyten kolokalisiert und kontrollieren komplementär die subsarkolemmale Konzentration von cGMP [206,207]. Auch in glomerulären Zellen der Nebennierenschale reguliert PDE2A3 die ANP-abhängige Inhibition der Aldosteron-Ausschüttung und damit die Wasser- und Elektrolythomeostase [208,209] (s. Abschnitt 1.5.1). PDE2A3 moduliert in Herzmuskelzellen die β -adrenerge Stimulation durch negative Rückkopplung der membranständigen Adenylylzyklase-Aktivität (s. Abschnitt 1.5.1), wobei PDE2A3 die hormonell induzierte Herzmuskelkontraktion über den cAMP-Spiegel reguliert [210]. PDE2A2 ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und reguliert die Atmung [211]. Im Zellkern ist PDE2A an der nukleären Translokation von Aryl-Hydrocarbon-Rezeptoren beteiligt [212]. Die Beteiligung von PDE2 an essentiellen physiologischen Prozessen in menschlichen Organen wie Gehirn, Herz und Lunge begründet die pathobiochemische Relevanz von PDE2-Inhibitoren [213]. Hochselektive Inhibitoren, wie z.B. das cNMP-Analogon BAY 60-7550 [214], inhibieren im Tiermodell die Ödembildung und verbessern das Gedächtnis durch Erhöhung der synaptischen Plastizität [210,215,216].

1.5.9 PDE2A-Struktur und -Mechanismus

HsPDE2A tritt in 6 Isoformen auf, die durch alternatives Spleißen generiert werden [167]. Sie unterscheiden sich von der Referenzsequenz PDE2A3 (Isoform 3) durch Deletionen am N- und C-Terminus (Isoformen 1, 2, 5, 6) sowie durch alternative Sequenz (Isoform 6) [202,203,211]. Die membranständige PDE2A3 trägt an Position Gly2 einen Myristoyl- und an Cys5 und Cys11 jeweils einen Palmitoylanker [203,217].

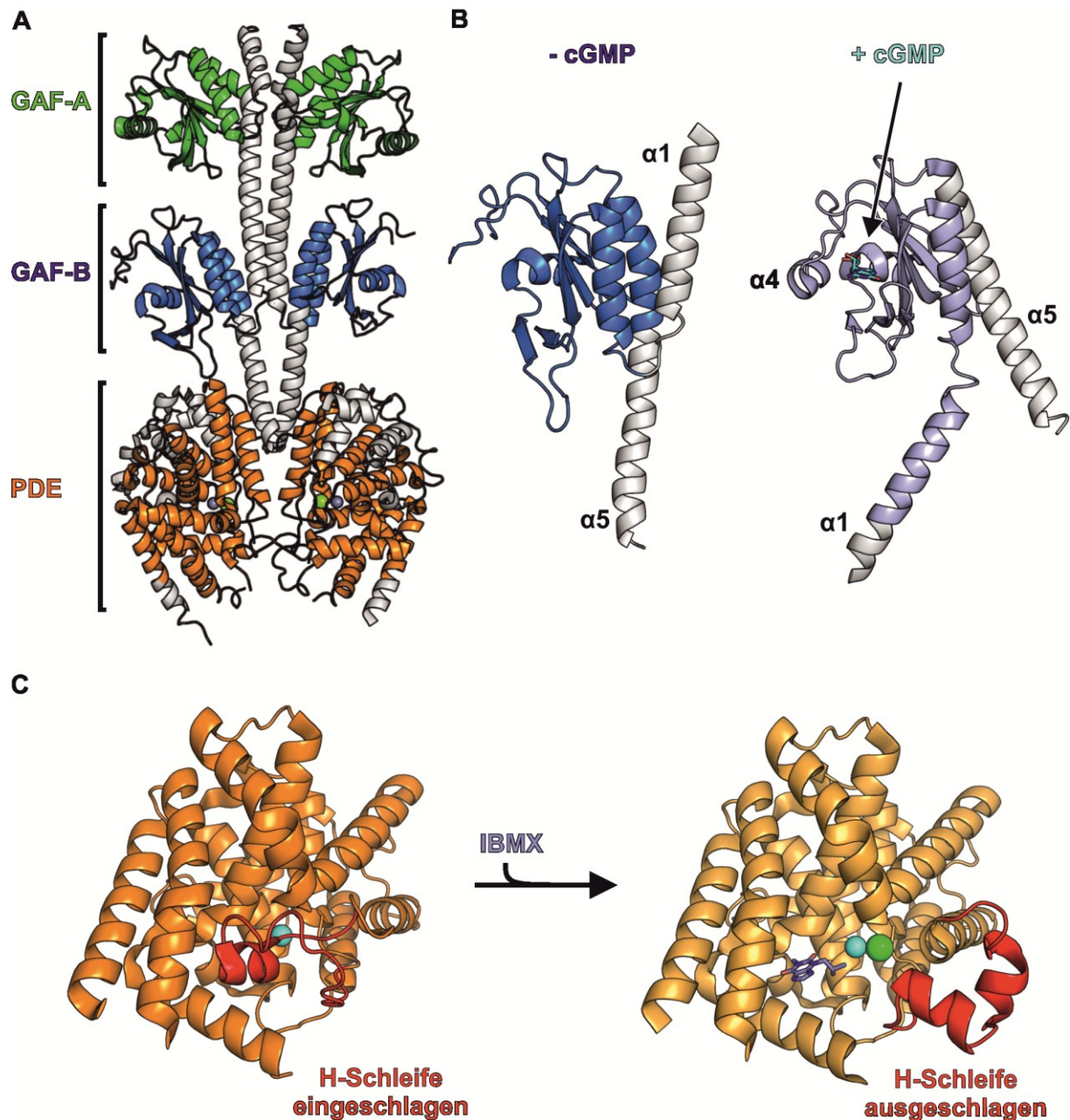


Abbildung 15. Struktur des GAF-A—GAF-B—PDE-Tandems, der GAF-Domäne und PDE-Domäne von HsPDE2A. **A.** Dimeres, paralleles GAF-A—GAF-B—PDE-Tandem mit Mg^{2+} und Zn^{2+} ohne Substratanalogon (PDB-Code:3IBJ) [200]. **B.** GAF-B-Untereinheit ohne cGMP (PDB-Code:3IBJ; links) und mit cGMP (PDB-Code:1MC0; rechts). **C.** Untereinheit der isolierten PDE-Domäne in geschlossener Konformation ohne Substratanalogon (PDB-Code:3ITM; links) und in offener Konformation mit IBMX (PDB-Code:3ITU; rechts); die konservierte H-Schleife ist rot markiert [200]. Die Unterschiede zwischen 1MC0 und 3IBJ bezüglich der Stellung von Helix $\alpha 1$ und $\alpha 5$ sind nicht nur durch cGMP-Bindung bedingt, sondern vermutlich auch durch verschiedene Kristallisationsbedingungen und die deletierte PDE-Domäne.

Eine *HsPDE2A*-Struktur mit chemosensorischem GAF-Tandem, katalytischem PDE-Modul und fehlendem N-Terminus ($\Delta N = 1-214$) wurde gelöst [200] (PDB-CODE: 3IBJ; Abbildung 15A). *HsPDE2A* kristallisiert als Kopf-an-Kopf-angeordnetes paralleles Dimer; ein axiales Rückgrat aus einem α -helikalen Bündel durchzieht das gesamte Homodimer vom N- zum C-Terminus. In selber Richtung wird das Helixbündel von GAF-A-, GAF-B- und katalytischen Domänen flankiert, und das GAF-Tandem wird mit dem PDE-Modul über einen Coiled-Coil-Linker verbunden (Aminosäurereste 548-571). Zwischen GAF-B- und PDE-Domäne liegt innerhalb des Coiled-Coils ein Überkreuzungspunkt, wodurch sich auf einer Seite der axialen Symmetrie-Ebene des Dimers jeweils ein GAF-A—GAF-B-Tandem und eine PDE-Domäne von unterschiedlichen Untereinheiten (UEs) befinden [200] (Abbildung 15A). GAF-A- und GAF-B-Domänen fungieren als Dimerisierungs-Domänen, wobei die GAF-B-Domäne zusätzlich cGMP bindet [200,218] (Abbildung 13A & Abbildung 15B). Die katalytische PDE-Domäne einer UE bindet ein Zn^{2+} - (Me-1) und ein Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Kation (Me-2). Das aktive Zentrum einer jeden PDE-Untereinheit ist autonom katalytisch aktiv [188]. Die katalytische Domäne von PDE2A kommt in zwei strukturellen Zuständen vor (Abbildung 15C): In der Struktur von Apo-PDE (ohne Substrat) verschließt die sogenannte H-Schleife die Substratbindungsstelle im Monomer. Die geschlossene Konformation wird der inaktiven PDE zugeordnet, da der Zugang zum Substrat blockiert ist (PDB-Code: 3ITM) [200]. Die Struktur der PDE-Domäne mit cNMP-Analogon (IBMX) zeigt eine offene Konformation mit flexibler, dislozierter H-Schleife. Die offene Konformation wird der aktiven PDE zugeordnet, da der Zugang vom Substrat zum katalytischen Zentrum gesteigert wird (PDB-Code: 3ITU) [200].

In der dimeren Apo-Struktur von GAF-A—GAF-B—PDE verschließen sich die katalytischen Zentren der beiden UEs gegenseitig und schirmen sich so größtenteils vom äußeren Medium ab [200]. Die geschlossene Form wird durch eine ausgeprägte Dimerisierungsgrenzfläche der PDE-Domäne stabilisiert; die H-Schleifen jeder UE sind an der Ausbildung der Dimer-Grenzfläche beteiligt. Dem darauffolgenden Modell der allosterischen Regulation nach wird bei cGMP-Bindung die Quartärstruktur des GAF-B-Dimers umgelagert (Abbildung 16). Die Konformationsänderung wird über den helikalen Linker auf die PDE-Domänen übertragen, was eine Umordnung der katalytischen Dimer-Grenzfläche bewirkt. Die als Monomer aktiven PDE-Domänen öffnen sich dem Lösungsmittel, woraufhin die PDE-Aktivität steigt [200]. Auf-

grund der Konservierung der autoinhibierenden H-Schleife innerhalb der PDE-Superfamilie geht man von einem allgemeinen Regulationsmechanismus von Säuger-PDEs aus [200].

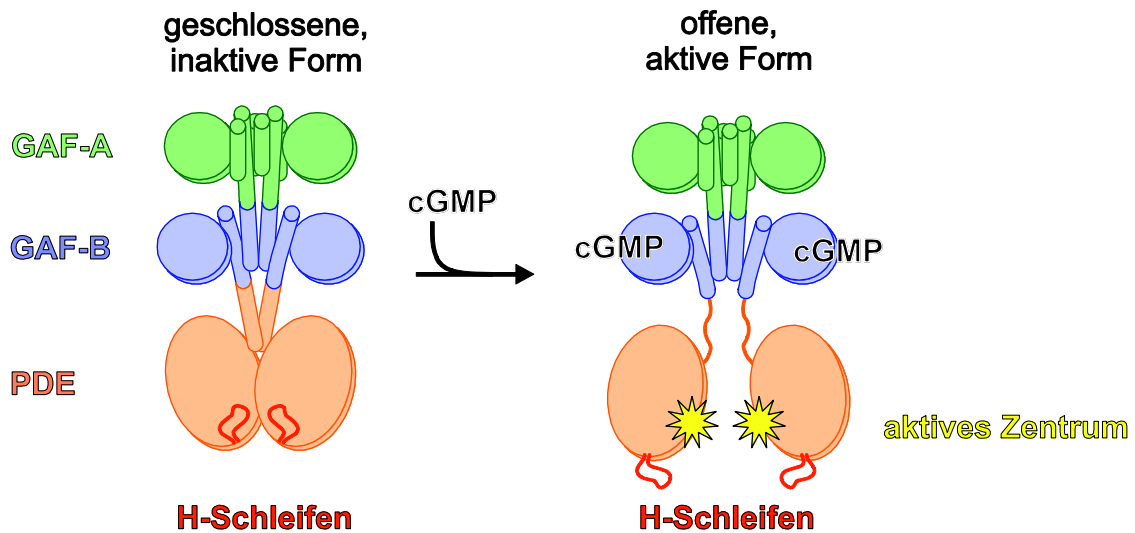


Abbildung 16. Aktivierungs-Modell von *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem), nach [200]. Geschlossene, inaktive Form (links): GAF-B-Domänen ohne cGMP; H-Schleifen (rot) verschließen das aktive Zentrum für Substrat. Offene, aktive Form (rechts): GAF-B-Domänen binden cGMP, und H-Schleifen öffnen den Zugang für Substrat zum aktiven Zentrum.

1.6 Ziel der Arbeit

Es soll eine rotlichtaktivierte Phosphodiesterase (LAPD, *light-activated phosphodiesterase*) konstruiert werden, welche die zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP hydrolysiert. Die LAPD soll hierzu als synthetischer Gruppe-II-Photorezeptor konzipiert werden: Die regulatorischen Domänen einer chemosensorischen Säuger-PDE sollen durch homologe photosensorische Domänen eines Photorezeptors funktional ausgetauscht werden. Ziel ist es somit, eine durch Bindung von Biomolekülen allosterisch regulierte Wildtyp-PDE in eine photosensorische synthetische LAPD zu transformieren. Um die Hydrolyse-Rate von cAMP und cGMP durch Licht des nahen Infrarotbereichs (650-800 nm) zu modulieren, soll für die Konstruktion der LAPD das photosensorische Modul (PCD, *photosensory core module*) eines Bakteriophytochroms (BPhy) verwendet werden. Das N-terminale photosensorische PAS-GAF-PHY-Tandem von BPhy soll mit einer C-terminalen humanen PDE gekoppelt werden (Abbildung 17), die aus den Säuger-Familien mit strukturell ähnlichem cNMP-bindendem GAF-Tandem stammt (PDE2, 5, 6, 10 & 11). Die Fusionsvorschrift der LAPD soll von Sequenzen und gelösten Strukturen von BPhys bzw. PDEs abgeleitet werden, wie z.B. von der PAS-GAF-PHY-Struktur aus *Pseudomonas aeruginosa* BPhy (*PaBPhy*) bzw. von der GAF-A—GAF-B—PDE-Struktur aus der humanen PDE2A (*HsPDE2A*). Die exakte Fusionsstelle innerhalb der Linkersequenzen zwischen Sensor- und Effektormodulen kann dabei über multiple Sequenzalignments und strukturelle Überlagerung *in silico* bestimmt werden.

Putative LAPD-Fusionskonstrukte sollen auf Grundlage eines kanonischen Phytochroms mit R/FR-Photozyklus, wie *Deinococcus radiodurans* BPhy, und eines Bathyphytochroms mit FR/R-Photozyklus, wie *PaBPhy*, gemäß gefundener *In-silico*-Fusionsvorschrift kloniert und in *E. coli* löslich exprimiert werden. Eine funktionale LAPD-Chimäre soll daraufhin *in vitro* photochemisch sowie enzymatisch charakterisiert werden.

Die Funktion der Linkersequenz bei der lichtabhängigen Signaltransduktion von sensorischer PCD zu effektorischer PDE soll im synthetischen Signalrezeptor LAPD über Deletions- und Insertionsmutation untersucht werden. Die PDE-Aktivität der generierten Linkervarianten einer funktionalen LAPD soll Aufschluss über die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität und Regulation von der Linkerbeschaffenheit geben. Ferner soll im Zusammenhang mit der

Signaltransduktion sowie der Anwendung die enzymatische Aktivität von Apo-LAPD ohne den Chromophor Biliverdin untersucht werden.

Die Eignung einer funktionalen LAPD für die optogenetische Anwendung soll in eukaryotischen Zellsystemen überprüft werden. In zellbasierten PDE-Assays sollen durch LAPD-Expression die Botenstoffe cAMP und cGMP *in vivo* lichtabhängig degradiert werden.

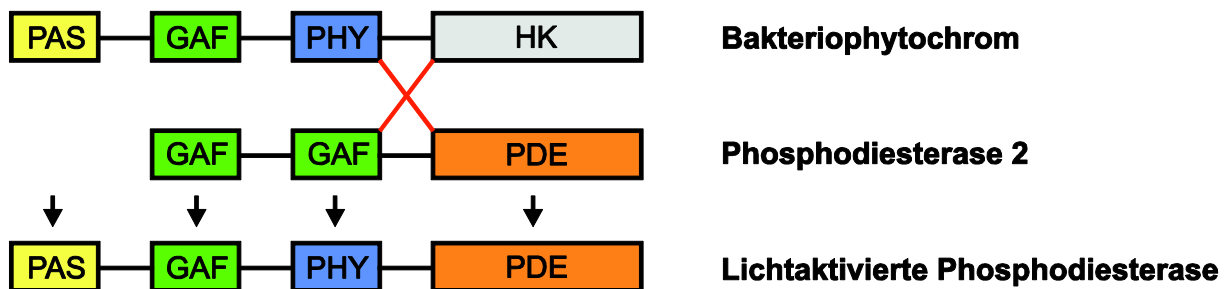


Abbildung 17. Ziel der Arbeit. Das photosensorische PAS-GAF-PHY-Tandem eines Bakteriophytochroms und die katalytische Effektor-Domäne einer Phosphodiesterase 2 sollen zu einer rotlichtaktivierten PDE kombiniert werden (HK = Histidinkinase).

2 Material und Methoden

2.1 Medien und Puffer

Zur Zellkultivierung verwendete Medien und Puffer wurden vor dem Einsatz bei 120 °C autoklaviert und auf 22 °C abgekühlt oder beim Hersteller steril bezogen. Hitzelabile Zusätze wie Antibiotika wurden in der angegebenen Arbeitskonzentration sterilfiltriert und dem handwarmen Medium oder bei 22 °C nachträglich zugesetzt. Vor Zugabe zur eukaryotischen Zellkultur wurden Medien im Wasserbad bei 37 °C temperiert. Zur Herstellung von Medien wurde einfach destilliertes, von Puffern und Lösungen bidestilliertes Wasser verwendet.

Tabelle 1. Antibiotika und Additiva.

Arbeitskonzentration	Firma
50 µg ml ⁻¹ Ampicillin	(Roth)
30 µg ml ⁻¹ Chloramphenicol	(Roth)
50 µg ml ⁻¹ Kanamycin	(Roth)
100 µg ml ⁻¹ Streptomycin	(Roth)
0,2 µg ml ⁻¹ Anhydrotetrazyklin	(IBA/ Roth)
1 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	(Roth)
25 – 100 µM Biliverdinhydrochlorid (BV·HCl)	(Frontier Scientific)
5 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin·HCl (TCEP·HCl)	(Roth)

2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E.-coli*-Stämmen fand in flüssigem LB-Medium (1% (m/V) Trypton, 0,5% (m/V) Hefeextrakt, 1% (m/V) NaCl; Fa. Amresco) oder auf festem Medium (LB-Medium, 1% (m/V) Agar) im Brutschrank bei 30 U min⁻¹ oder bei 225 U min⁻¹ im Schüttelinkubator (Eppendorf) jeweils bei 37 °C statt.

Tabelle 2. *E.-coli*-Stämme

<i>E.-coli</i>-Stamm	Genotyp
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80/lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara\ leu)$ 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> λ^-
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
CmpX13	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) <i>manX::ribM</i>
Rosetta (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)

2.2.1 Kulturen zur Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung im Nano- bis Mikrogramm-Maßstab (MiniPrep) wurden 5 ml LB-Kulturen mit entsprechenden Antibiotika in sterilisierten Glasröhrchen mit Einzelkolonien von festem LB-Medium mithilfe einer sterilen Impföse angeimpft und über Nacht oder 8 h bei 37 °C und 30 U min⁻¹ inkubiert.

Zur Plasmidisolierung im Mikro- bis Milligramm-Maßstab (MidiPrep) wurden 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit 100 µl einer 8-h-Vorkultur (5-ml-Maßstab) angeimpft; die Hauptkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 225 U min⁻¹ im Schüttelinkubator gezüchtet.

2.2.2 Expressionstests in *E. coli*

Zur analytischen Expression von Fusionsproteinen im 5-ml-Maßstab wurde LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika in Glasröhrchen mit Einzelkolonien von festem Medium mit Hilfe einer sterilen Impföse angeimpft und bei 37 °C und 30 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5-0,7 kultiviert. Anschließend wurden die LB-Kulturen 15 min bei 225 U min⁻¹ auf eine Expressionstemperatur von 16 °C gekühlt. Vor der Induktion und nach der Expressionszeit wurden jeweils 500 µl Flüssigkultur entnommen, durch Zentrifugation bei 14300 g und 4 °C 1 min (Eppendorf) vom Überstand getrennt und das Pellet in 200 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von entsprechendem Induktionsmittel in Anwesenheit von 0,5 mM δ -Aminolaevulinsäure; die Expressionskulturen wurden 18 h bei 16 °C 225 U min⁻¹ inkubiert. Des Weiteren wurden 1,5 ml Expressionskultur zentrifugiert

(s.o.), im selben Volumen Aufschlusspuffers resuspendiert und über Ultraschall mit einer 3 mm Mikrospritze (Sonifier II 250 Digi, Branson) in einem gekühlten Metallblock lysiert (30 s Pulsdauer; 30 s Pulsintervall; 10% Beschallungsamplitude; 2 min Netto-Beschallungszeit). Das Lysat wurde 1 h bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet in 200 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 60 µl Überstand mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die entnommenen Proben wurden bei 95 °C 10 min hitzedenaturiert und durch SDS-PAGE analysiert. Die SDS-Proben beinhalteten eine einheitliche Bakterienmenge, die über die OD₆₀₀ eingestellt wurde.

2.2.3 Expressionskultur

Zur Proteinherstellung wurden mit entsprechendem Expressionsvektor transformierte *E.-coli*-Zellen der Stämme CmpX13 [219] oder BL21 (DE3) 5-ml-LB-Vorkulturen mit entsprechenden Antibiotika bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5-0,7 kultiviert. 0,5-2 ml Vorkultur wurden in 500 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überführt und die Hauptkultur bei 37 °C und 225 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,3-0,5 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur auf 16 °C für 30 min bei 225 U min⁻¹ gekühlt und mit 0,5 mM δ-Aminolaevulinsäure und 0,67 mM NaOH versetzt. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,2 µg ml⁻¹ Anhydrotetrazyklin (pASK43(+)-Vektor) oder 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (pET28c(+)-, pKT270-Vektor) induziert. Die Expressionskultur wurde 18 h bei 16 °C und 225 U min⁻¹ unter Ausschluss von Licht inkubiert.

2.2.4 Einführung von Transformationskompetenz

CaCl₂-kompetente Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E.-coli*-Zellen des Stammes DH10B wurden 800 ml LB-Medium mit 1 ml einer 5-ml-Übernachtskultur angeimpft und für 2-4 h bei 37 °C und 225 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,5-0,6 kultiviert. Die Zellen wurden für 10 min bei 7000 g und 4 °C zentrifugiert (Beckmann; Rotor JA-10), das Pellet in 160 ml 100 mM MgCl₂ resuspendiert und die Bakterien auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Zellpellet in 20 ml MgCl₂-Lösung resuspendiert und 10 min bei 4000 U min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert (Beckmann; Rotor JA-10). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 8 ml Transformationspuffer (100 mM CaCl₂, 15% Glycerin) resuspendiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf 50 µl-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Elektrisch kompetente Zellen

Elektrokompetente *E.-coli*-Zellen sämtlicher verwendeter Expressionsstämme wurden hergestellt, indem 2x 1 l LB-Medium mit 2x 1 ml einer 5-ml-Übernachtskultur angeimpft wurden und bei 37 °C und 225 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,6-0,9 inkubiert wurden. Nach Kultivierung wurde die Bakterienkultur für 15-60 min auf Eis gelagert und im Anschluss vereinigt in 6 x 500-ml-Zentrifugenbecher bei 5000 U min⁻¹ für 5 min zentrifugiert (Beckmann; Rotor JA-10). Die Zellpellets wurden in 6 x 400 ml sterilisiertem ddH₂O resuspendiert, erneut zentrifugiert (s.o.) und vereinigt in 2 x 400 ml sterilisiertem ddH₂O aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in 2 x 10 ml 10% (V/V) Glycerin resuspendiert und bei 3500 U min⁻¹ für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Megafuge, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 2 x 1 ml 10% (V/V) Glycerin resuspendiert und als 50-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C verwahrt. Im 30-ml-Maßstab wurden *E.-coli*-Zellen in 6x 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum ca. 4 h nach Animpfung von festem LB-Medium kultiviert, bis eine sichtbare Trübung entstanden war. Die Zellen wurden im 50-ml-Reaktionsgefäß vereinigt und durch 10 min Zentrifugation bei 3500 U min⁻¹ und 4 °C (Megafuge, Eppendorf) und Resuspension in 40 ml sterilem ddH₂O zweimal gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Zellpellet in 10 ml 10% (V/V) sterilem Glycerin aufgenommen, zentrifugiert und in 150 µl 10% (V/V) sterilem Glycerin resuspendiert; die Aliquotierung und Aufbewahrung erfolgten wie oben beschrieben.

2.2.5 Herstellung von Stammkulturen

Zur dauerhaften Konservierung von Plasmiden und Bakterienstämmen wurden transformierte bzw. nicht-transformierte Klone in 5 ml LB-Kulturen bis zu einer OD₆₀₀ = 0,3-0,7 kultiviert. 1 ml Bakteriensuspension wurde in einem Kryo-Röhrchen mit 500 µl 50% (V/V) Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.6 Festes Medium

Die Kultivierung von *E. coli* aus ausgestrichener Stammkultur, überimpfter Flüssigkultur und ausplattierten Transformationsansätzen erfolgte auf festem LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37 °C über Nacht im Inkubator oder bei 22 °C über 2-3 Tage.

2.3 Eukaryotische Zellkultur

Die Experimente zur eukaryotischen Zellkultur wurden in steriler Umgebung eines Zellkulturlabors unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt, wurden sterile Puffer und Medien auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Die Kultivierung von CHO-Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂.

2.3.1 Aktivierung und Herstellung von CHO-Stammkulturen

Ein bei -80 °C gelagertes DMSO-Stammkultur-Kryo-Röhrchen der cGMP-detektierenden Reporterzelllinie M15 + olf GC-A 2-2 [213] wurde zunächst bei 37 °C im Wasserbad bis zur Bildung eines Flüssigkeitsfilms zwischen Zellklumpen und Gefäßwand angetaut und nach Überführung in 10 ml auf dieselbe Temperatur vorgewärmtes MEM Alpha Eagle's Medium (Standard-MEM + Vitamin B12, Ascorbinsäure, nicht-essentielle Aminosäuren, Natriumpyruvat, Liponsäure, D-Biotin, Desoxyribonukleotide, Ribonukleotide, UltraGlutamine 1; Fa. Lonza; + 20% FKS, ohne Antibiotika) in einem Reaktionsgefäß (Falcon) vollständig aufgetaut. Nach Zentrifugation bei 500 g für 3 min wurde das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert, in eine T-25-Kulturflasche (Greiner) überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Konfluenz inkubiert (2-3 Tage).

Zur Herstellung von DMSO-Stammkulturen von CHO-Zellen wurden $1-2 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Medium und 10% DMSO nach Passage suspendiert und in einem Kühlbehälter (Nalgene) mit Isopropanol bei -80 °C innerhalb von 24 h eingefroren.

2.3.2 Kultivierung von CHO-Zellen

Die Anzucht von CHO-Zellen erfolgte in T25- oder T75-Kulturflaschen mit MEM Alpha Eagle's Medium mit 10% FKS vor der ersten Passage nach Auftauen ohne Antibiotika und ab der zweiten Passage mit 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 0,25 mg/ml Zeocin, 1 mg/ml Geneticin (G-418). Die Einsaat erfolgte in T25- oder T75-Kulturflaschen mit $0,4 \cdot 10^6$ in 5 ml bzw. $1,2 \cdot 10^6$ Zellen in 15 ml Medium; die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Konfluenz inkubiert. Bei pH-Abfall wurde das Medium abgenommen und durch ein gleiches Volumen neuen Mediums ersetzt. Zur Zellpassage in neue Kulturflaschen oder Stammkultur wurde bei Konfluenz das Medium verworfen, die adhärennten Zellen mit 2-3 ml (für T25) PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄; Fa. Biochrom) gewaschen und mit 0,3-0,4 ml (für T25) Trypsin (Biochrom) 1 min bei

37 °C abgelöst. Der Verdau wurde durch Aufnahme der Zellen in 5 ml (für T25) Medium mit 20% FKS gestoppt, die Zellen bei 500 g für 3 min zentrifugiert und 4,5 ml des Überstandes verworfen. Das Zellpellet wurde in 7 ml Medium resuspendiert, in einer Zählkammer unter einem Lichtmikroskop (Zeiss) gezählt und in entsprechender Zahl/Volumen erneut in T25- oder T75-Kulturflaschen eingesät.

2.3.3 Transfektion von CHO-Zellen

Zur transienten Transfektion von CHO-Zellen mit pEGFP-N1-Vektor wurden zunächst nach Ablösung, Vereinzelung und Auszählung der Zellen in eine 96er-Mikrotiterplatte (Greiner) $1 \cdot 10^5$ Zellen in 300 µl Medium (10% FKS, Antibiotika) pro Vertiefung eingesät und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Transfektion erfolgte nach 24 h. Dazu wurde die Transfektionsmischung (N µl Fugene HD (Roche) + N µg Plasmid in 250 µl Medium, entsprechend der Anleitung) 20 min bei 22 °C inkubiert; bezüglich des Verhältnisses von Transfektionsreagenz [µl] zu Plasmid [µg] wurden 10 Startbedingungen getestet. Die Zellen wurden mit 60 µl Transfektionsansatz pro Vertiefung 2 d bei 37 °C und 5% CO₂ im Dunkeln inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Transfektionsmedium entfernt und zur Rekonstitution von Holo-LAPD durch 300 µl Medium mit 25 µM Biliverdin ersetzt und 3 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.4 *In-vivo*-Assay in PDE-Reporterzellen

Zum Monitoring der cGMP-Spaltung in CHO-Zellen wurde ein *In-vivo*-Assay (*static mode*) durchgeführt [213]. Hierzu wurde zunächst von der 96er-Mikrotiterplatte mit transfizierten Zellen das Biliverdin-haltige Medium abgenommen, und die adhärennten Zellen wurden mit je 300 µl PBS dreimal pro Well gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl calciumfreier Tyrode-Lösung (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 4,8 mM NaHCO₃; pH 7,4) mit 5 µg/ml Coelenterazin versetzt und 3 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Lösung wurde durch 300 µl calciumfreie Tyrode-Lösung mit 5 µg/ml Coelenterazin, 0,1% BSA und ANP (0,01°-100 nM) ersetzt und für 6 min inkubiert; während dieser Zeit fand die Licht- bzw. Dunkeladaptation statt. Nach Abnahme der Lösung wurde die Messung durch Zugabe von 300 µl Calcium-haltiger Tyrode-Lösung (+3 mM CaCl₂, 5 µg/ml Coelenterazin, 0,1% BSA und ANP (0,01 – 100 nM)) gestartet und das Lumineszenzsignal im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M200 Pro, TECAN) aufgezeichnet. Die Spezifität der LAPD-induzierten Reaktion wurde durch Zugabe des membrangängigen und löslichen spezifischen PDE2-Inhibitors BAY 60-7555 (Axxora Life Science) überprüft [213].

2.4 Elektrophysiologie mit Oozyten

2.4.1 Präparation von Oozyten

Zur Gewinnung von Oozyten für den elektrophysiologischen Funktionstest wurden Oozytenlappen aus *Xenopus laevis* durch Frau Maila Reh (AG Experimentelle Biophysik, Prof. Hegemann) operativ entnommen. Nach mechanischer Öffnung der äußeren Ovariepithel durch zweistündigen Verdau mittels 2 mg/ml Collagenase IA (Sigma) in calciumfreiem ORI-Messpuffer (96 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM MOPS; pH 7,5) bei 18 °C und 200 U min⁻¹ wurde die Follikelepithel entfernt. Selektierte Oozyten der Reifestadien IV bis VI wurden bis zur Injektion in Calciumhaltigen ORI-Messpuffer (+2 mM CaCl₂, 50 U/l Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin (Sigma); pH 7,5) bei 18 °C im Inkubator aufbewahrt.

2.4.2 Injektion von Oozyten

Injektionskapillaren wurden mittels eines Ziehgerätes (P-97, Sutter Instruments) aus Glaskapillaren (0,5 mm Durchmesser, WPI) angefertigt. Mit einem Mikroinjektor (Nanoliter 2000, WPI) wurden 36,8 nl entsprechender RNA-Lösung in den vegetativen Pol der Oozytenzelle injiziert. Bis zur elektrophysiologischen Messung wurden die Oozyten in 96er-Mikrotiterplatten in ORI-Messpuffer mit oder ohne 25 µM Biliverdin bei 18 °C 3-5 d inkubiert.

2.4.3 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Die elektrophysiologischen Messungen von CNG-vermittelten Membranströmen in Oozyten wurden mit einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt: In einer Messzelle bestehend aus Bad-, Referenzelektrode und 2 Agarbrücken wurde die Oozyte in ORI-Messpuffer unter einem Lichtmikroskop (Zeiss) mittels eines Mikromanipulators von Strom- und Potentialelektrode am vegetativen Pol angestochen; Strom- und Potentialelektrode wurden vorher aus Glaskapillaren (Borosilikat, GC-150 TF-7.5, Durchmesser 1,17 mm, CEI) mit einem Ziehgerät (s.o.) angefertigt, mit chlorierten Silberdrähten (Ag-10T, Ag-25T, Science Products) versehen und mit Elektrolytlösung (3 M KCl) befüllt. Die Messung der Membranströme erfolgte mit dem Verstärker Turbo TeC-03X (NPI). Die Oozyten wurden mit einer Xenonlampe (U-ULS75XE, Olympus optical) über einen Lichtleiter (Durchmesser 2 mm, Laser Components GmgH) bestrahlt. Die Beleuchtungsintervalle wurden über einen Shutter (Uniblitz LS6 ZM2, Vincent Associates) geregelt, die Lichtqualität über Breitbandfilter (450 nm) eingestellt. Als zweite Lichtquelle für die Anregung bei 690 nm bzw. 473 nm

diente ein Polychrome II (TillPhotonics). Über die Software pClamp 9 (Axon Instruments) wurde das Setup angesteuert und die Signale nach Verarbeitung durch einen Digital-Analog-Wandler (Digidata 1322A, Axon Instruments) aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Clampfit (Axon Instruments); Zeit-Strom-Kurven wurden mittels Origin 8.1 (OriginLab Corporation) anhand der Basislinie korrigiert und dargestellt.

2.5 Molekularbiologie

2.5.1 Transformation von *E. coli*

CaCl₂-kompetente Zellen des Stammes DH10B wurden zur Selektion positiver Klone in Ligations- und Mutagenese-Reaktionsansätzen mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurden 50 µl angetauter Zellsuspension mit 5-10 µl Ligation- oder Mutagenese-Reaktionsansatz gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte 90 s bei 42 °C und wurde durch eine 2-minütige Inkubation auf Eis gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen mit 300 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 750 U min⁻¹ und 37 °C im Thermoblock (Eppendorf) geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 4000 g in der Tischzentrifuge (Eppendorf) vom Überstand abgetrennt, das Volumen durch Abnehmen auf 100 µl reduziert und das Zellpellet im verbleibenden Medium resuspendiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf 20 ml festem LB-Medium (1% Agar) mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Die Einführung von Expressionsvektoren in elektrisch kompetente Zellen der Stämme CmpX13 und BL21 (DE3) wurde durch Elektroporation bewerkstelligt. Hierzu wurden 50 µl Zellsuspension schnell aufgetaut, auf Eis mit 0,5 µl Plasmidlösung gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Im Elektroporator (Eppendorf) wurde eine Spannung von 1700 V angelegt und mindestens 4-6 ms entladen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension unmittelbar mit 200 µl LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. 10 µl Transformationsansatz wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.5.2 Plasmidisolierung

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte im Nano- bis Mikrogramm-Maßstab mittels NucleoSpin® Plasmid Kit MINI (Macherey & Nagel). 5 ml einer Über-

nacht- oder 8-h-Kultur wurden 10 min bei 4000 g zentrifugiert (Eppendorf) und die Zellen einer alkalischen Lyse unterzogen. Durch Neutralisation wurde die genomische DNA gefällt und das Plasmid renaturiert, das über eine Anionenaustauscher-Säule isoliert und in 30 µl 5 mM Tris-HCl pH 8,0 (AE-Puffer, Macherey & Nagel) eluiert wurde.

Die Plasmidisolierung im Mikro- bis Milligramm-Maßstab wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit MIDI (Macherey & Nagel) bewerkstelligt. Hierzu wurde nach Bestimmung der OD₆₀₀ ein entsprechendes Volumen einer 100 ml Übernachtskultur 10 min bei 3500 U min⁻¹ zentrifugiert (Zentrifuge, Eppendorf) und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet. Mit 70% (V/V) Ethanol präzipitierte und gewaschene Plasmid-DNA wurde nach Trocknung in sterilem ddH₂O gelöst und die Konzentration und Reinheit der Probe bestimmt.

2.5.3 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentration von DNA in schwach gepufferter Lösung aus Plasmidisolierung und Gelextraktion wurde in einem UV/vis-Photometer (Eppendorf) über die Absorption bei 260 nm in einer 1:50-Verdünnung in 5 mM Tris-HCl pH 8,0 bestimmt. Die Reinheit der DNA-Probe wurde mittels Verhältnis der Absorptionen A_{260}/A_{280} sowie A_{260}/A_{230} quantifiziert.

2.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden analytisch und präparativ in 1% (m/V) Agarose-Gelen in 1 x TBE-Puffer (90 mM Tris-Base; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8,0) getrennt. DNA-Proben wurden mit 1x Probenpuffer Ficoll/OrangeG (2,5% (m/V) Ficoll 400, 1 paar Körner Orange-G-Farbstoff) versetzt und bei konstanter Spannung aufgetrennt (150 V; 45 W; 10-20 min). DNA-Fragmente wurden mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff MIDORI Green Advanced (7,5 µl/100ml; Fa. Intas) unter einer UV-Lampe bei 312 nm nachgewiesen und mit einer CCD-Kamera (8-Bit, Intas) dokumentiert. Die Fragmentgröße in Basenpaaren (bp) wurde über Vergleich mit einem Größenstandard (1 kb ladder, Fermentas) bestimmt.

2.5.5 Reinigung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarose-Gelen und Restriktionsansätzen und von Plasmiden aus Mutagenese-Ansätzen

Zur präparativen Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das NucleoSpin® Extract II (Macherey & Nagel) verwendet. Dazu wurde die Bande bestimmter Größe aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, in einem entsprechenden Volumen (200 µl NT-Puffer/ 100 mg Gel) bei 50 °C durch Schütteln aufgelöst und auf

eine Anionenaustauscher-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 30 µl 5 mM Tris·HCl pH 8,0 (NE-Puffer, Macherey & Nagel). Zur Reinigung von PCR-Produkten nach präparativem Restriktionsverdau und aus Mutagenese-Ansätzen wurden diese mit einem entsprechenden Volumen NT-Puffer versetzt und dem Protokoll NucleoSpin® Extract II (Macherey & Nagel) unterzogen; die Elution erfolgte wie oben beschrieben.

2.5.6 Sequenzierung von DNA

Die Bestimmung von Plasmidsequenzen erfolgte nach der Kettenabbruchmethode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. Das Sequenzierergebnis wurde mit der Software GENTle dargestellt. DNA-Sequenzierungen wurden von Dr. Martin Meixner (ABI373 BigDye-Terminator, Institut für Genetik, HU Berlin) und von GATC Biotech (Konstanz) durchgeführt.

2.5.7 Klonierung

Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente aus genomischer DNA und Plasmiden wurden über PCR amplifiziert. Der PCR-Ansatz wurde für genomische DNA mit 1-50 ng µl⁻¹ oder für Plasmid-DNA mit 0,01-0,2 ng µl⁻¹ Template-DNA, je 0,5 µM forward- und reverse-Primer, 200 µM dNTPs (je 200 µM dA, dG, dC und dT) und 0,02 U µl⁻¹ Phusion Polymerase (Thermo Scientific) in 1 x HF- oder GC-Puffer (Phusion, Thermo Scientific) in einem Endvolumen von 20 oder 50 µl zusammengestellt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte in einem Thermocycler (Biorad). Im Anhang (s. Abschnitt 6.4.2) sind die den jeweiligen Amplifikaten zugeordneten PCR-Programme mit Abweichungen zum oben beschriebenen Standard-Reaktionsansatz (Phusion, Thermo Scientific) sowie die zugehörigen Oligonukleotid-Primer angeführt.

In *E.-coli*-Kultur amplifizierte DNA wurde für die Klonierung mittels präparativen Restriktionsverdaus aus dem vektoriellen Kontext nach Protokoll (s.u. und Abschnitt 2.5.5) ausgeschnitten und entsprechend weiterverarbeitet.

Gensequenzen mit *E.-coli* (*HsPDE2A*; AS 553-941)- und *H.-sapiens* (*DrBPhy*; AS 1-506)-adaptierter Kodonbenutzung wurden von Genart (Regensburg) mit entsprechenden Restriktionsstellen (*HsPDE2A*; *DrBPhy*) zur Subklonierung synthetisiert.

Präparativer Restriktionsverdau von Vektor- und Fragment-DNA

Je 30 µl DNA-Lösung aus Plasmidisolierung (4-12 µg Vektor-DNA) und aus Gelextraktion von PCR-Fragmenten wurden zu zwei separaten Restriktionsansätzen von 41 µl mit 0,25 U µl⁻¹ entsprechenden Restriktionsenzymen (FastDigest, Fermentas) in 1 x Restriktionspuffer (Fermentas) ergänzt. Die Restriktion erfolgte 1 h bei 37 °C. Um bei der folgenden Ligation eine Selbstligation des Plasmidrückgrates zu unterbinden, wurden 15 min vor Ablauf der Inkubation dem Restriktionsansatz mit der Vektor-DNA 0,2 U µl⁻¹ arktische Phosphatase (Fermentas) zur Dephosphorylierung zugesetzt. Alle enzymatischen Reaktionen wurden entsprechend der Anleitung (Fermentas) durch Hitze inaktiviert. Die Reaktionsprodukte wurden im Falle des Vektors mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese, im Falle des Fragments mit der Reinigung für PCR-Produkte isoliert.

Ligation von Vektor und Fragment

50-100 ng geschnittener und dephosphorylierter Vektor wurden mit entsprechendem Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:5 in einen Ligationsansatz von 10 µl mit 0,05 Weiss U µl⁻¹ T4-Ligase (Fermentas) in entsprechendem Ligationspuffer mit ATP (Fermentas) eingesetzt und 1 h oder über Nacht bei 22 °C inkubiert. DH10B-Zellen wurden im Anschluss mit dem gesamten Ligationsansatz transformiert. Ausgewählte Kolonien wurden kultiviert, isolierte Plasmid-DNA mittels analytischen Restriktionsverdaus auf positive Klone hin untersucht und diese durch Sequenzierung überprüft. Das korrekte Konstrukt wurde in einen entsprechenden Expressionsstamm von *E. coli* transformiert.

Analytischer Restriktionsverdau

2 µl Plasmid-DNA-Lösung wurden mit 8 µl eines 1,25-fachen Restriktionsansatzes mit 0,25 U µl⁻¹ entsprechenden Restriktionsenzymen (FastDigest, Fermentas) pipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.5.8 Ortsgerichtete Mutagenese

Der Austausch von Aminosäureresten sowie Linkervarianten von LAPD wurde über ortsgerechte Mutagenese nach dem QuikChange-Protokoll (Invitrogen, Life Technologies, Frankfurt) im pASK43(+)-Kontext generiert. Der Austausch von einzelnen Aminosäureresten wurde durch ein- bis zweifachen Nukleotidaustausch innerhalb eines Kodon-Tripletts, Linkervarianten durch Insertions- und Deletionsmutanten

von Kodon-Tripletts einfacher Aminosäurereste realisiert. Der Mutagenese-Ansatz wurde mit 10-50 ng Template-DNA, je 10 pmol forward- und reverse-Primer, 200 μM dNTPs (je 200 μM dA, dG, dC und dT) und 0,05 U μl^{-1} *Pfu*-Polymerase in 1x *Pfu*-Polymerase-Puffer (20 mM Tris·HCl, 10 mM NH_4SO_4 , 10 mM KCl, 0,1 mg ml^{-1} BSA, 0,1% (v/v) Triton X-100, 2 mM MgSO_4 , pH 8,8; Thermo) in einem Endvolumen von 25 μl zusammengestellt. Bei Amplifikation von Sequenzen, die von genomischer DNA aus *Deinococcus radiodurans* abgeleitet waren, wurde den PCR-Ansätzen 5% DMSO zugesetzt. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem Thermocycler nach Programm in Tabelle 2 durchgeführt. Nach erfolgter PCR-Reaktion wurde die bakterielle Template-DNA im Reaktionsansatz mit $\sim 0,2$ U μl^{-1} *DpnI* für 1 h bei 37 °C verdaut und anschließend dem Protokoll zur Reinigung von PCR-Fragmenten des NucleoSpin® Extract II (Macherey & Nagel) unterzogen. Zur Selektion positiver Klone wurden DH10B-Zellen mit 10 μl des gereinigten Reaktionsansatzes transformiert, Plasmide in ausgewählten Bakterienkolonien durch Kultivierung amplifiziert und deren Beschaffenheit nach DNA-Isolierung durch Restriktionsanalyse überprüft. Die eingeführten Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die gewünschte Plasmid-DNA wurde in den entsprechenden Expressionsstamm von *E. coli* transformiert. Im Anhang (s. Abschnitt 6.4.3) sind der Austausch von Aminosäureresten sowie Insertions- und Deletionsvarianten mit entsprechenden Oligonukleotid-Primern dargestellt.

Tabelle 3. PCR-Programm der ortsgerichteten Mutagenese.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale	95 °C	1 min	1
Denaturierung			
Denaturierung	95 °C	30 s	22
Annealing	53 °C	1 min	22
Elongation	68 °C	10 min	22
Finale Elongation	68 °C	10 min	1
Reaktionsstopp	10 °C	∞	1

2.5.9 mRNA-Herstellung (*In-vitro*-Transkription)

Zur Präparation von mRNA für die Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten wurde das mMESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit (Ambion) verwendet. Dazu wurde zunächst das die entsprechende Sequenz *H.-sapiens*-adaptierter Kodonbenutzung tragende pGEM-HE-Plasmid durch Restriktionsverdau mit *NheI* (FastDigest, Fermentas, Thermo Scientific) linearisiert, mittels Protokoll zur Reinigung von PCR-Fragmenten des NucleoSpin® Extract II (Macherey & Nagel) gereinigt und in einen 15 µl Transkriptionsansatz eingesetzt: 500 ng linearisierte Template-DNA, 5 µl T7 2x NTP/ARCA, 1,5 µl 10x T7-Reaktionspuffer und 1 µl T7 Enzym-Mix in nukleasefreiem Wasser. Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37 °C im Thermoblock (Eppendorf) inkubiert, die mRNA durch Zugabe von 25 µl LiCl-Lösung über Nacht bei -20 °C präzipitiert und durch Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C (Beckmann) vom Überstand getrennt. Das Pellet wurde mit 100 µl 70% (V/V) Ethanol gewaschen, nach Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C in der Speedvac getrocknet und in 20 µl nukleasefreiem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Photospektrometer (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm; die Güte der mRNA wurde nach Denaturierung bei 75 °C mittels 1%iger Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die RNA wurde in Aliquots zu je 3 µl bei -80 °C gelagert.

2.6 Proteinchemie

Alle Arbeitsschritte mit Photorezeptor-Proteinproben wurden, soweit nicht anders vermerkt, auf Eis oder bei 4 °C und unter schwachem Grünlicht durchgeführt.

2.6.1 Zellernte, Zellaufschluss und Affinitätschromatographie

E.-coli-Zellen aus Expressionskultur wurden bei 6000 U min⁻¹ 6 min bei 4 °C geerntet (Beckmann Coulter, Rotor JLA-10) und das erhaltene Zellpellet in Aufschlusspuffer (50 mM Tris·HCl, 20 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 mM TCEP·HCl; pH 8,0 + 1 Tablette/40 ml Puffer A Complete Ultra-Protease-Inhibitor-Mix (Fa. Roche)) resuspendiert (Zwischenlagerung bei -20 °C). Die homogene Zellsuspension wurde mit 1 Spatelspitze DNase I (Roche) und Lysozym (aus Hühnereiweiß, Fluka) versetzt, und mittels Ultraschall (Sonifier II 250 Digi, Branson) über eine Mikrospitze (Ø = 3 mm) erfolgte der Zellaufschluss in einem Rosettengefäß auf Eis. Die Pulsdauer betrug 30 s bei einem Pulsintervall von 30 s und einer Beschallungsamplitude von 40%; die Netto-Beschallungszeit war 3 min (entspricht 6 Zyklen). Das Lysat wurde nach erfolgtem Zellaufschluss bei 18000 U min⁻¹ und 4 °C 30 min zentrifugiert

(Beckmann Coulter, Rotor JA 25.50) und der Überstand unter leichtem Schwenken mit 100 μ M Biliverdinhydrochlorid (Frontier Scientific) und 5 mM Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP \cdot HCl, Roth) bei 4 °C 1 h inkubiert. Das Fusionsprotein wurde durch Affinitätschromatographie über eine Cobalt-NTA-Säule (1,5 ml Säulenbett/ 1 l *E.-coli*-Kultur; Gravitationsfluss; HisPur Cobalt Resin, Thermo Scientific, Bonn) gereinigt: 4x Niedrigsalzpuffer (Puffer B: 50 mM Tris \cdot HCl, 50 mM NaCl, 5 mM TCEP \cdot HCl; pH 8,0; V_{ges} = 20 ml Puffer B/ml Resin), 4x Hochsalzpuffer (Puffer C: 50 mM Tris \cdot HCl, 1 M NaCl, 5 mM TCEP \cdot HCl; pH 8,0; V_{ges} = 11 ml Puffer C/ml Resin) und 4x Puffer B (V_{ges} = 11 ml Puffer B/ml Resin). Die Elution des mit C-terminalem His-Tag markierten Proteins erfolgte über Stufenelution mit Imidazolpuffer (50 mM Tris \cdot HCl, 20 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 5 mM TCEP \cdot HCl; pH 8,0) in Fraktionen à 1 ml (Puffer D). Die vereinigten Fraktionen wurden durch Dialyse gegen je 1 l Aufbewahrungspuffer ohne (Dialysepuffer I: 20 mM Tris \cdot HCl, 20 mM NaCl, 7 mM β -Mercaptoethanol; pH 8,0) und mit 20% Glycerin (Dialysepuffer II: 20 mM Tris \cdot HCl, 20 mM NaCl, 7 mM β -Mercaptoethanol, 20% (V/V) Glycerin; pH 8,0) über Nacht bzw. ~ 6 h vom Imidazol-Überschuss befreit (Dialysemembran: Cellulose MWCO = 10 kDa, Roth). Das Dialysat wurde in einem Größenausschluss-Filter (MWCO = 10 kDa, Pall) bei 4000 g (Megafuge, Eppendorf) bis zu einer OD₇₀₀ von 0,1-0,2 einkonzentriert und zur Analyse weiterverwendet oder aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Der Verlauf der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE und UV/vis-Spektroskopie analysiert.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie Silber-, Coomassie-Brilliant-Blue- und Zn-induzierter Fluoreszenznachweis

Proteinproben wurden über Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli [220] analysiert (Trenngel: 11% (m/V) Rotiphorese 40, 375 mM Tris \cdot HCl, 0,1% (m/V) SDS, 1 mM Zinkacetat; pH 8,8. Sammelgel: 4% (m/V) Rotiphorese 40, 125 mM Tris \cdot HCl, 0,1% (m/V) SDS, 1 mM Zinkacetat; pH 6,8). 20 μ l flüssiger Probe wurden mit 10 μ l 4x SDS-Probenpuffer versetzt, 1 Pipettenspitze fester Probe in 50 μ l 1x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris \cdot HCl, 2% (m/V) SDS, 0,1% (m/V) SDS, 10% (V/V) Glycerin, 1% (V/V) β -Mercaptoethanol, 12,5 mM EDTA, 0,02% (m/V) Bromphenolblau; pH 6,8) resuspendiert und die Proben 10 min bei 95 °C gekocht. Die Trennung erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris \cdot HCl, 250 mM Glycin, 0,1% (m/V) SDS, 1 mM Zinkacetat; Fa. Roth) bei konstanter Stromstärke von 35-40 mA pro Gel. Die

getrennten Protein-Banden wurden im Gel durch Aufkochen in Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung (0,2% (m/V) Coomassie Brilliant Blue G 250, 0,05% (m/V) Coomassie Brilliant Blue R 250, 41% Ethanol, 5% Methanol, 10% Essigsäure) gefärbt und durch wiederholtes Aufkochen in destilliertem Wasser gegen den entfärbten Hintergrund sichtbar gemacht. Alternativ wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Polyacrylamid-Gel 10 min in 50 ml Fixierlösung (50% (V/V) Methanol, 5% (V/V) Essigsäure, 0,1% (V/V) Formaldehyd) geschwenkt, 5 min in Wasser gewaschen und 1 min in 50 ml Sensitizer-Lösung (0,02% (m/V) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) inkubiert. Anschließend wurde das Gel 10 min mit 50 ml 0,1% (m/V) Silbernitratlösung behandelt und in Entwickler-Lösung (2% (m/V) Na_2CO_3 , 0,0008% (m/V) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,1% (V/V) Formaldehyd) gelegt. Das Gel wurde bis zu einem genügenden Kontrast entwickelt und die Reaktion mittels Zugabe von 0,02-0,04% (m/V) Natriumzitrat (Stopp-Lösung) und 5-10-minütiger Inkubation beendet. Das apparente Molekulargewicht wurde über Vergleich mit einem vorgefärbten Protein-Marker (PageRuler Prestained HMW, Fermentas) bestimmt, der mit jeder SDS-PAGE analysiert wurde. Kovalent gebundenes Biliverdin im rekonstituierten Holo-Photorezeptor wurde über zinkinduzierte Fluoreszenz nachgewiesen [221]. Hierzu wurden die entsprechenden Proteinbanden direkt im SDS-Gel, das 1 mM Zinkacetat enthielt, mit UV-Licht (312 nm, Lampe) belichtet.

Die Gele wurden zur Dokumentation der Nachweisreaktionen in einer Kammer (Intas) fotografiert und zur Aufbewahrung zwischen zwei Cellophanfolien (Roth) in Glycerinlösung (Roth) bei 22 °C getrocknet.

2.6.3 Immunblot (Western Blot)

Für einen Immunblot gegen Proteine mit N- oder C-terminalen His-Tags wurden zunächst Proteinproben mittels SDS-PAGE in 10%igen Polyacrylamidgelen getrennt. In einer Tank-Blot-Kammer (Biorad) wurden die Proteine in Transferpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20% (V/V) Methanol; pH 8,3) unter Eiskühlung bei 175 mA/Gel für 1 h auf eine methanolaktivierte PVDF-Membran (Immobilon-P, 0,45 μm , Millipore) entsprechend Anleitung (Biorad) überführt. Der erfolgreiche Transfer von Protein wurde unspezifisch mit reversibler Ponceau-S-Färbung (0,5% (m/V) Ponceau S, 1% Essigsäure) mit 10 ml Färbelösung überprüft. Zum Unterbinden unspezifischer Wechselwirkungen zwischen PVDF und Antikörpern wurde die Membran 1 h bei 22 °C in 10 ml Blocking-Puffer (PBS + 5% (m/V) Magermilchpulver, 0,1% (V/V) TWEEN) inkubiert. Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde die Membran

anschließend 2 x 15 min in PBS-Puffer gewaschen und mit primärem Anti-His-Tag-Antikörper (Maus; Calbiochem) in 10 ml Antikörper-Puffer (PBS + 0,5% (m/V) Magermilchpulver, 0,1% (V/V) TWEEN) in einer Verdünnung von 1:2000 über Nacht bei 22 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Membran wurde 2 x 15 min in PBS-Puffer gewaschen, und der alkalische-Phosphatase-(AP)-gekoppelte sekundäre Antikörper (anti-mouse IgG, Ziege, Sigma) wurde in derselben Verdünnung in 10 ml Antikörperlösung für 2,5 h bei 22 °C unter leichtem Schwenken appliziert. Die Detektionsreaktion erfolgte in Detektionspuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$; pH 9,5) für 2 min unter Zugabe von 0,15 mg/ml BCIP und 42,4 μ g/ml NBT und wurde durch Entfernen der Entwicklungslösung gestoppt.

2.6.4 HPLC-basierter *In-vitro*-PDE-Assay

Die enzymatische Aktivität von *DrBPhy-HsPDE*-Fusionsproteinen wurde mittels eines HPLC-basierten PDE-Assays bestimmt. Die Reaktion lief bei 25 °C mit 5 nM Enzym in 1x PDE-Puffer (50 mM Tris-HCl, 8,3 mM $MgCl_2$, 50 μ g·ml⁻¹ BSA, 7 mM β -Mercaptoethanol; pH 8,0) in einem entsprechenden Volumen (~220 - 1500 μ l) ab und wurde durch Zugabe von 25-2000 μ M cGMP oder cAMP in Endkonzentration (Stammlösung jeweils in 25 mM Tris-HCl; pH 8,0) gestartet. Die Reaktionen wurden, soweit in einem abweichenden Belichtungsprotokoll nicht anders vermerkt, entweder in Dunkelheit (d.h. bei schwachem Grünlicht) oder unter Beleuchtung durchgeführt; vor Reaktionsstart wurde eine entsprechende Beleuchtung oder Dunkeladaptation von 2 min durchgeführt. Die Belichtung wurde mit einem Interferenzfilter (ThorLabs, Dachau) bei einer Wellenlänge von 690 nm (HWB 10 nm, Leistung 3,3 mW cm⁻²) oder LEDs der Wellenlängen 455 nm (HWB 20 nm, Leistung 75 mW cm⁻²) und 850 nm (HWB 30 nm, Leistung 28 mW cm⁻²) realisiert. Die Beleuchtung mit Weißlicht erfolgte mit einer Tungsten-Halogen-Kaltlichtquelle (150 W, DCR III, Schott, Southbridge, MA, USA). Nach einer Reaktionszeit von 15 s bis 2 min wurden dem Reaktionsansatz Aliquots von 220 μ l entnommen, um die Reaktion bei 95 °C für 10 min durch Hitzedenaturierung zu stoppen. Die Proben wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 14300 g und 4 °C (Centrifuge 5424R, Eppendorf) von präzipitiertem Protein befreit und mittels Filtration durch Mikrofilter für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorbereitet (0,2 μ m Porengröße, Chromafil, Macherey-Nagel, Düren). Das HPLC-Gradientsystem bestand aus einer HPLC-Pumpe (K-1001), einem UV/vis-Durchflussphotometer (K-2600), einem

automatischen Probensammler (Autosampler, K-3900), einem 4-Kanal-Lösungsmittel-Organizer (K-1500), einem Online-Degasser (K-5004) (alle Geräte von Knauer, Berlin) und einer LC-18-T-Vorsäule (Supelguard: 2 cm x 4 mm; 3 μ m Partikelgröße). cGMP und GMP wurden auf einer C-18-Umkehrphasen-Säule (Supelco: 15 cm x 4.6 mm, 5 μ m Partikelgröße Sigma-Aldrich, München) mittels isokratischer Bedingungen mit Ionenpaarreagenz (Puffer cG: 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 4 mM Tetrabutylammoniumiodid, 10% (V/V) Methanol; pH 5,9) getrennt. Die Trennung von cAMP und AMP erfolgte auf derselben C-18-Umkehrphasen-Säule über Elution durch einen Gradienten (Puffer cA: 125 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 ; pH 5,5; Puffer cA.2: 94 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 25% (V/V) Acetonitril; pH 5,5; Flussrate; Gradient: 0-70% Puffer cA.2 in 12,5 min) [222]. Edukte (cNMP) und Produkte (NMP) wurden bei beiden Verfahren aus einem Probenvolumen von 50 μ l bei einer Flussrate von 0.7 ml/min innerhalb einer Gesamtlaufzeit von 30 min analysiert und mit einer festen Wellenlänge von $\lambda = 253$ nm UV/vis-spektroskopisch detektiert. Die Datenaufzeichnung und -auswertung wurde mit der Software ClarityChrom (Version 2.6.5.517, Knauer) sowie Origin (Origin Lab Corp., Northhampton, MA, USA) vorgenommen. Die erhaltenen Peaks wurden anhand der spezifischen Retentionszeiten der Standardsubstanzen dem Edukt (cNMP) und dem Produkt (NMP) zugeordnet und die entsprechenden Flächen integriert. Ein interner Standard wurde für jedes Chromatogramm ermittelt, um Unterschiede in der Probenauftragung zu eliminieren, was der Normalisierung der Produktmenge auf die Summe von Produkt- und Eduktmenge entsprach. Die Kalibrierung der HPLC erfolgte über eine cGMP- und cAMP-Konzentrationsreihe der Standardsubstanzen (1-150 μ M cNMP).

Enzymatische Assays erfolgten in Doppelbestimmung; Reaktionsansätze der Substratkonzentration 500 und 1000 μ M wurden vor der Messung mit 1x Reaktionspuffer 1:5 bzw. 1:10 zweimal verdünnt. Die ermittelten Eduktumsätze in Mikromol (s.o.) sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 und 4 Messungen (25-100 μ M bzw. 500 und 1000 μ M). Die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion v_0 wurde als Anfangssteigung im Konzentration-Zeit-Diagramm über die Methode der kleinsten Quadrate ermittelt und ist als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die Maximalgeschwindigkeit v_{\max} der enzymatischen Reaktion und die Michaelis-Konstante K_M wurden im Michaelis-Menten-Diagramm über Fit der Anfangsgeschwindigkeiten an die hyperbolische Funktion erhalten; sie sind jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

2.6.5 Fluoreszenz-basierter *In-vitro*-PDE-Assay

Die PDE-Aktivität wurde alternativ über einen fluoreszenzbasierten Assay gemessen, der von C. Schumacher und H. Körschen (Cesar-Institut, Bonn) innerhalb eines vom Autoren betreuten Praktikums etabliert wurde (Abbildung 18). 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5(6)-Carboxyfluoreszein (BCECF) ist ein Fluorophor, dessen Fluoreszenzquantenausbeute sich mit sinkendem pH-Wert verringert; der pK_a -Wert von BCECF liegt bei $\sim 6,98$ und erlaubt die Messung von Änderungen der H_3O^+ -Konzentration im Bereich 10^{-8} - 10^{-6} M. Das Exzitationsspektrum hat ein Maximum bei $\lambda_{Ex} = 500$ nm, das Emissionsspektrum bei $\lambda_{Em} = 535$ nm; der isosbestische Punkt liegt bei $\lambda_{IB} = 439$ nm, d.h. die Wellenlänge, bei der die Fluoreszenzintensität bei veränderlichem pH konstant ist [223]. Bei der Hydrolyse von cNMP zu NMP wird ein Proton freigesetzt, so dass die Reaktion in schwach gepufferter Lösung über die Fluoreszenzabnahme zeitlich verfolgt werden kann. 60 μ l Assay-Puffer II (Assay-Puffer I + 0,5 μ M BCECF (Invitrogen); pH 7,6) wurden mit 10 μ l in Assay-Puffer I (2 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 100 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 0,04% (w/v) BSA; pH 7,6) verdünnter gereinigter Proteinprobe vermischt; die Enzymkonzentration im Reaktionsansatz betrug 1-500 nM. Die Proben wurden vor Reaktionsbeginn entweder 30-60 s im Dunkeln adaptiert oder mit den entsprechenden Lichtquellen beleuchtet (s. Abschnitt 2.6.4). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 4,8 mM Substrat (cGMP oder cAMP) gestartet (\triangleq 2 mM Endkonzentration). Die enzymatische Reaktion wurde in 96er-Mikrotiterplatten (Greiner; schwarze Wandung) durchgeführt und die Fluoreszenz in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan) gemessen. Belichtet wurde BCECF bei $\lambda_{Ex} = 500$ nm und $\lambda_{IB} = 439$ nm, die Fluoreszenzintensität wurde bei $\lambda_{Em} = 535$ nm und innerhalb von 2 h in einem Zeitintervall von $\Delta t = 30$ s aufgezeichnet. Die Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{Ex} = 500$ nm wurde mit derjenigen bei $\lambda_{IB} = 439$ nm normiert, um Konzentrationsschwankungen des Fluorophors zu berücksichtigen:

$$I_{\text{normiert}}(\lambda_{Em} = 535 \text{ nm}) = \frac{I(\lambda_{Ex} = 500 \text{ nm})}{I(\lambda_{Ex} = 439 \text{ nm})}$$

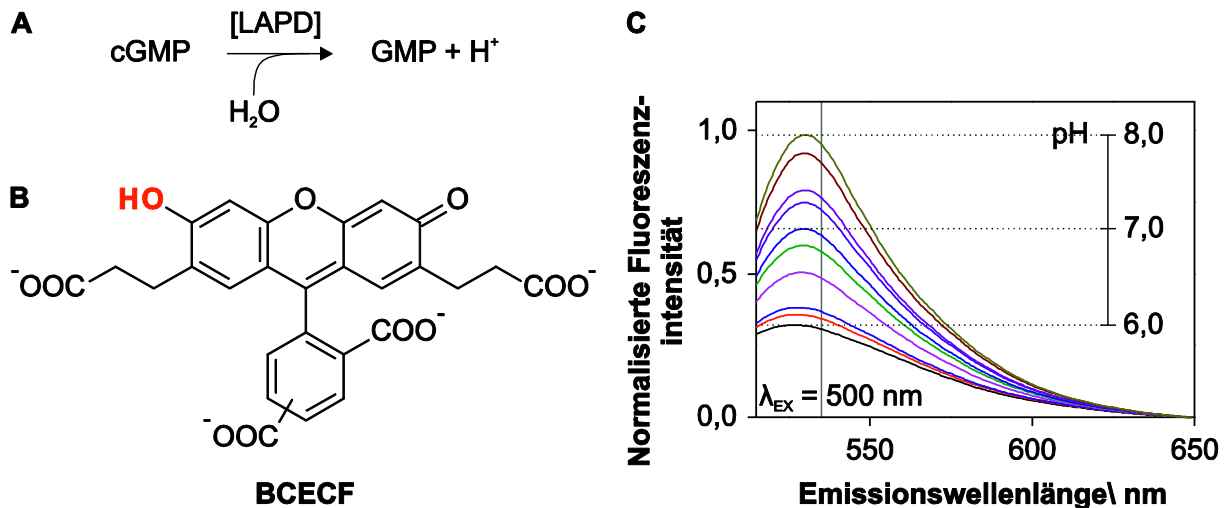


Abbildung 18. BCECF-basierter fluorimetrischer Nachweis der cNMP-Hydrolyse-Aktivität von LAPD. **A.** LAPD hydrolysiert cGMP zu GMP, wobei ein Proton freigesetzt wird und es daher zur Ansäuerung von schwach gepufferten Reaktionsmedien kommt. **B.** 2',7'-Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoreszein (BCECF) ist ein Fluoreszeinderivat, das eine saure Hydroxylgruppe (rot) mit einem pK_a -Wert von $\sim 6,98$ trägt [224]. **C.** Fluoreszenzemissionsspektren von BCECF bei einer Exzitationswellenlänge (λ_{EX}) von 500 nm in Abhängigkeit vom pH-Wert (Titration): Mit sinkendem pH-Wert von 8,0 (olivgrün) auf 6,0 (schwarz) nimmt die Fluoreszenzintensität ab, da die Hydroxylgruppe im sauren Puffer überwiegend protoniert vorliegt. In diesem pH-Bereich ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität linear. Während der cGMP-Hydrolyse durch LAPD erfolgt in schwach gepuffertem Reaktionsmedium durch Protonenbildung ebenfalls eine Fluoreszenzabnahme von anwesendem BCECF (Schumacher, 2015, *akzeptiert*). Nach obiger Formel wurden die Emissionsspektren mit der Fluoreszenzemissionsintensität am isosbestischen Punkt (IP) $\sim 439 \text{ nm}$ der BCECF-Protolysereaktion korrigiert [225] und mit der maximalen Fluoreszenzemissionsintensität bei pH 8,0 normiert. Die Messung der BCECF-Fluoreszenz erfolgt gewöhnlich bei 535 nm (graue vertikale Linie). Die Spektren wurden in Zusammenarbeit mit C. Schumacher aufgenommen.

2.7 UV/vis-Absorptionsspektroskopie

Soweit nicht abweichend beschrieben, wurden alle spektroskopischen Messungen mit einem Agilent 8453 UV/vis-Spektrophotometer (PDA, Agilent Technologies, Waldbronn) unterstützt von entsprechender Software durchgeführt. Die Proteinprobe wurde auf eine $\text{OD}_{700} = 0,05\text{-}0,2$ verdünnt und in einer Quarzküvette gegen die zugehörige Referenzlösung bei 22°C (10 mm Schichtdicke) vermessen. Die erhaltenen Spektren wurden mit Origin (s.o.) ausgewertet.

Stationäre UV/vis-Spektren des licht- und dunkeladaptierten Zustandes wurden nach entsprechender Beleuchtung oder Dunkeladaptation von 200-1000 nm aufgenommen und anhand der Referenzgrundlinie bei $\lambda = 900 \text{ nm}$ korrigiert. Die Werte der UV/vis-Spektren wurden mit Hilfe eines gleitenden Mittelwerts geglättet.

2.7.1 Rückkehrkinetik aus dem Photorezeptor-Signalzustand

Um die Relaxation des Photorezeptors nach Anregung durch Licht entsprechender Wellenlänge und Intensität in den Dunkelzustand zu verfolgen (s. Abschnitt 2.6.4), wurden bei 22 °C Spektrenserien aufgenommen. Hierzu wurde die Probe vor der kinetischen Messung so lange mit einer bestimmten Intensität bestrahlt, bis ein photostationäres Gleichgewicht erreicht wurde. Ausgehend von diesem Zustand wurde die Aufnahme der Spektren unmittelbar nach Verdunklung gestartet und bis zu 6 h beobachtet. Die zeitaufgelösten Messungen wurden den photochemischen Reaktionsgeschwindigkeiten mit bestimmten Zeitintervallen angepasst (Integrationszeit $\Delta t = 30$ s; nach $t = 3$ h logarithmisch). Die Zeitkonstanten der Rückkehr-Reaktionen wurden über mono- und biexponentielle Approximation der Zerfallskurven bei einer festen Wellenlänge mit Hilfe von Origin (s.o.) ermittelt.

2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration des Holoproteins in Lösung wurde über die Absorption des Biliverdin-Chromophors am isosbestischen Punkt bei $\lambda = 724$ nm mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 45700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nach Subtraktion der Basislinie bei $\lambda = 900$ nm ermittelt [70].

2.7.3 Biliverdin-Bestimmung in Phytochromen

Der Anteil der Inkorporation von Biliverdin durch das Bakteriophytochrom wurde durch Denaturierung von LAPD-Proben mit 6,5 M Guanidiniumhydrochlorid UV/vis-spektroskopisch bestimmt. Die Konzentration von Holoprotein, d.h. Chromophor, wurde über den Extinktionskoeffizienten von freiem Biliverdin von $39000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei $\lambda = 388$ nm ermittelt, wobei die denaturierenden Bedingungen einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Absorption von Biliverdin bei dieser Wellenlänge haben [157]. Die Menge an Gesamtprotein wurde über die Absorption bei 280 nm auf Grundlage des theoretisch berechneten Extinktionskoeffizienten von $117230 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ([http://web.expasy.org/Compute pI/Mw tool](http://web.expasy.org/Compute_pI/Mw_tool)) und unter Abzug der anteiligen Absorption von Biliverdin bei dieser Wellenlänge bestimmt.

2.8 Bioinformatik

2.8.1 Planung von Klonierungen

Lokale Sequenzalignments, Klonierungsstrategien, Primer-Design sowie die Erstellung von Plasmidkarten wurden von dem Programm GENTle (<http://gentle.magnusmanske.de>) unterstützt. Multiple Sequenzalignments erfolgten mit ClustalX 2.1. Primer-Eigenschaften wurden vom OligoAnalyzer Tool 3.1 vorhergesagt (<https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Zur Überprüfung von Restriktionsstellen wurde der NEB cutter V2.0 verwendet (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Stille Mutationen zur Einführung von Restriktionsstellen wurden mit der silent-Funktion des EMBOSS explorer geplant (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/silent>). Lokale Alignments von DNA- und Proteinsequenzen innerhalb entsprechender Datenbanken wurden vom BLAST-Algorithmus von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt. Die Recherche von Proteinsequenzen erfolgte mit Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Die Festlegung von Domänengrenzen sowie Multidomänen-Alignments wurde innerhalb der Pfam-Datenbank (<http://pfam.xfam.org/>) ausgeführt.

2.8.2 Strukturanalyse

Die Strukturen von *HsPDE2A* (PDB: 3IBJ) und *PaBPhy* (PDB: 3C2W) wurden mit Hilfe der Software LSQKAB bezüglich ihrer GAF-B- bzw. PHY-Domänen überlagert. Die Rotationsmatrix dieser Transformation lautet $\begin{bmatrix} 0.023 & 0.446 & -0.895 \\ 0.247 & -0.870 & -0.427 \\ -0.969 & -0.211 & -0.130 \end{bmatrix}$, der Translationsvektor $[-59.5 \text{ \AA}, 30.2 \text{ \AA}, 105.8 \text{ \AA}]$. Die initiale Fusionsvorschrift LAPD+2 wurde anhand des strukturbasierenden Linkeralignments definiert; die Fusionsstelle in der *DrBPhy*-Sequenz wurde durch das Alignment von Proteinen mit PHY-Domänen-Architektur in der PFAM-Datenbank (<http://pfam.xfam.org>) ermittelt. Auf Grundlage der strukturellen Superposition wurde ein LAPD+2-Modell generiert; hierzu wurden die C-terminalen Helizes der PHY-Domäne von *PaBPhy* an den N-terminalen Helizes der katalytischen Domäne von *HsPDE2A* manuell orientiert, um eine hinreichende Überlappung zu erzielen. Proteinmoleküle wurden mit PyMOL (Schrödinger, LLC) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwurf und Expression von lichtaktivierten Phosphodiesterasen

3.1.1 *In-silico*-Planung von Bakteriophytochrom-Phosphodiesterase-2A-Chimären

Um eine rotlichtaktivierte Phosphodiesterase zu entwerfen, wurde zunächst eine Überlagerung von ähnlichen BPhy-PCD- (*photosensory core domain*) und PDE-Strukturen durchgeführt (Abbildung 19). In der Planungsphase lag das PAS-GAF-PHY-Tandem von *PaBPhy* als einzige vollständige Struktur einer homodimeren, parallelen PCD mit Biliverdin vor (PDB-Code: 2C3W; Abbildung 9A) [35]. *HsPDE2A* war als einziges vollständiges GAF-A—GAF-B—PDE-Konstrukt aufgelöst (PDB-Code: 3IBJ; Abbildung 19) [200]. Die strukturelle Überlagerung wurde bezüglich des β -Faltblatts der GAF-B- (PDB-Code: 3IBJ; Aminosäurereste 385-560; β 1-6) und der PHY-Domäne (PDB-Code: 3C2W, Aminosäurereste 310-497; β 1-5) durchgeführt (s. Abschnitt 6.1.1).

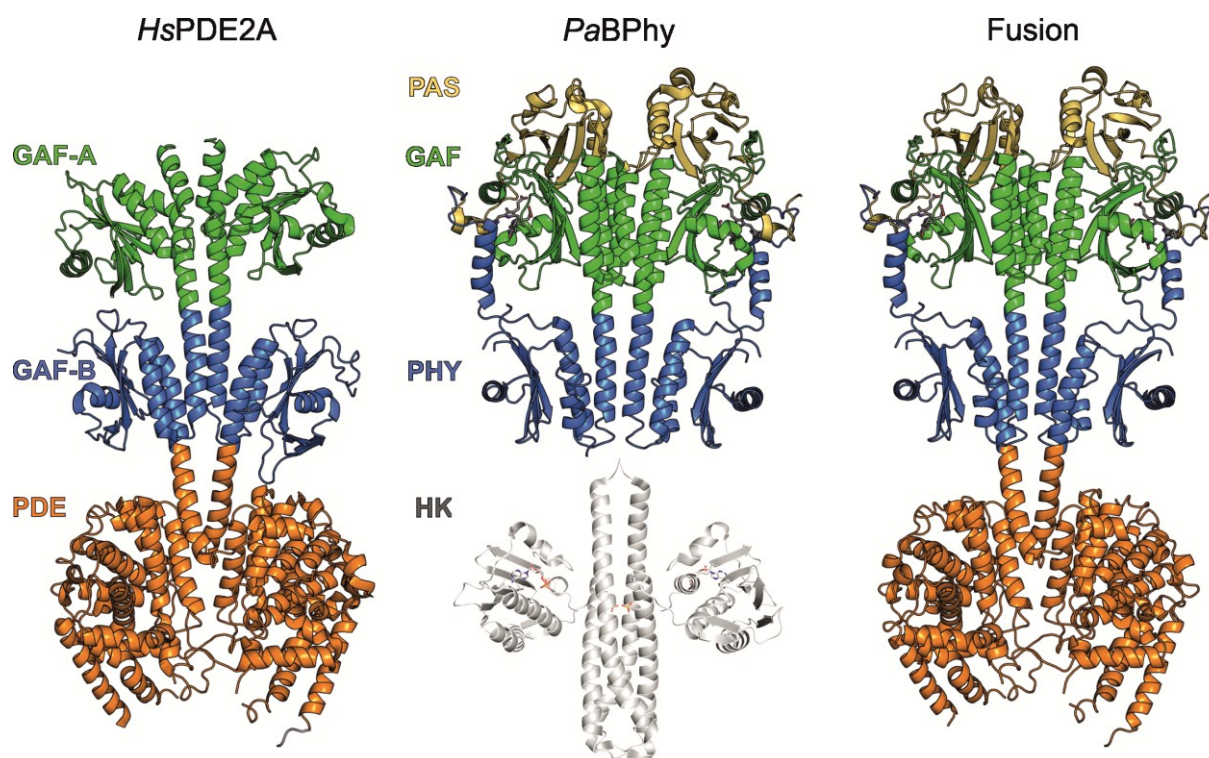


Abbildung 19. Konstruktion der rotlichtaktivierten Phosphodiesterase. Die Raumstrukturen von *HsPDE2A* (links: GAF-A—GAF-B—PDE-Tandem; PDB-Code: 3IBJ) [200] und *PaBPhy*-PCD (Mitte oben: PAS-GAF-PHY-Tandem; PDB-Code: 3C2W) [34] sind parallele Dimere mit ausgedehnten α -helikalen Grenzflächen. Die regulatorischen GAF-A- und GAF-B-Domänen in PDE2A entsprechen

strukturell den GAF- und PHY-Domänen in BPhy. Für das nicht-gelöste BPhy-Effektor-Modul ist *Thermogata maritima* HK853 (**Mitte unten**: Histidinkinase (HK)-Domäne; PDB-Code: 2C2A) [113] gezeigt (für eine ausführliche Beschreibung von 3IBJ und 3C2W s. Abbildung 15 bzw. 9). Das Strukturmodell der chimären PDE (**rechts**: Fusion) [226] vereint das N-terminale regulatorische PAS-GAF-PHY-Tandem von BPhy mit der C-terminalen katalytischen Domäne von PDE2A.

Die C-Termini beider regulatorischer Domänen (GAF-B und PHY) sind α -Helizes und gehen im Fall von *HsPDE2A* in den Coiled-Coil-Linker (LH2) über (Abbildung 20A). Die entsprechenden PHY-hEs (Helizes E der PHY-Domäne) von *PaBPhy* werden vermutlich ebenso in einem helikalen Linker fortgesetzt (Abbildung 19, Mitte). Ein strukturbasiertes Linkeralignment legte das Fusionsraster der Aminosäurereste fest und grenzte damit die Fusionsstelle zwischen den parentalen Proteinen ein (Abbildung 20B). Die exakte Verbindungsstelle wurde anhand von Konstruktionsregeln bestimmt, die vom Design der lichtreprimierten Histidinkinase YF1 bekannt sind [15,137]: Konservierung der Tertiärstruktur aller Einzeldomänen, Vermeidung von Störungen der Quartärstruktur (insbesondere von Grenzflächen zwischen den Domänen und dem zentralen helikalen Rückgrat), Beibehaltung des Hydropathie-Musters innerhalb der Coiled-Coil-Linkersequenz (vgl. Abschnitt 1.4). Demnach wurde als primäres Konstrukt eine Fusion aus den Aminosäureresten 1-497 von *PaBPhy* und 553-941 von *HsPDE2A* definiert.

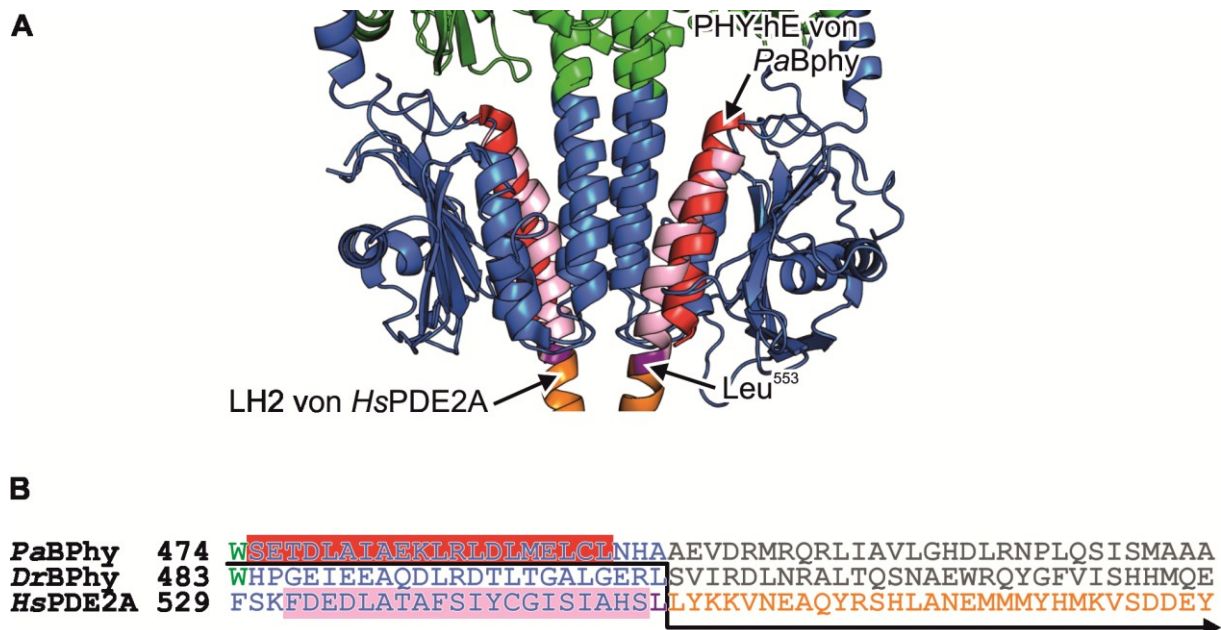


Abbildung 20. Detailaufnahme der strukturellen Überlagerung von *HsPDE2A* und *PaBPhy* und strukturbasiertes Linkeralignment von *PaBPhy*, *HsPDE2A* und *DrBPhy*. A. Strukturen von *HsPDE2A* (PDE-Code: 3IBJ) [200] und *PaBPhy* (PDE-Code: 3C2W) [34] wurden bezüglich ihrer GAF-B- bzw. PHY-Domänen überlagert. Die C-terminale Helix hE (rot) der *PaBPhy*-PHY-Domäne (blau)

überlappt räumlich mit der N-terminalen Helix LH2 (rosa) der katalytischen Domäne von *HsPDE2A* (orange). Die PDE-Domäne ist in LAPD+2 am Aminosäurerest Leu-553 (violett) mit dem PAS-GAF-PHY-Photosensor fusioniert. **B.** Das strukturbasierte Alignment der Linkerregionen von *PaBPhy*, *DrBPhy* und *HsPDE2A* diene als Konstruktionsvorschrift der initialen PDE-Chimären aus PDE und *PaBPhy* bzw. *DrBPhy*; deren Sequenz ist durch einen Pfeil hervorgehoben. Der in *PaBPhy* und *DrBPhy* konservierte Trp (W)-Rest ist grün hervorgehoben.

Dieses theoretische Konstrukt wurde als initiale Chimäre experimentell realisiert: Die DNA-Sequenzen von *PaBPhy*-PCD (in pET24(+); X.Yang, University of Chicago) und *HsPDE2A* (als pMA-T-*HsPDE2A*-553-941; Mr. Gene; s. Abschnitt 6.4.1) wurden zunächst jeweils über PCR amplifiziert (s. Abschnitt 6.4.2). *PaBPhy*-PCD wurde über Restriktion mit *NheI/HindIII* und Ligation in den Expressionsvektor pASK43(+) eingebaut. Nach Klonierung im *E. coli*-Stamm DH10B wurde das *HsPDE2A*-553-941-Amplifikat entsprechend über die Schnittstellen *KspAI/HindIII* in pASK43(+)_*PaBPhy*-PCD integriert (s. Abschnitt 6.4.2), um die Chimäre *PaBPhy*-PCD—*HsPDE2A*-553-941 im pASK43(+)-Kontext zu erhalten. Die Expression der *PaBPhy*-basierten PDE-Chimäre in *E. coli* lieferte letztlich nur geringe Ausbeuten eines stark verunreinigten Proteins (s. Abschnitt 6.1.1).

Parallel zur Konstruktion dieser Chimäre mit der PCD eines Bathyphytochroms mit FR/R-Photozyklus (*PaBPhy*) wurde die PDE2A-Domäne mit einer alternativen PCD aus einem kanonischen Bakteriophytochrom mit R/FR-Photozyklus fusioniert. Auf Grundlage des kanonischen Bakteriophytochroms aus *Deinococcus radiodurans* (*DrBPhy*) [55] wurde ein entsprechendes Fusionskonstrukt geplant. Da in dieser Projektphase nur *DrBPhy*-Strukturen als PAS-GAF-Tandem ohne PHY-Domäne vorlagen [67,68], war eine analoge strukturelle Überlagerung von *DrBPhy*-PCD und *HsPDE2A* zur Festlegung der Fusionsstelle in der Linkersequenz nicht möglich. Daher wurde im multiplen Sequenzalignment von PHY-Domänen der Datenbank Pfam (Pfam-Annotation: PF00360) die Schnittstelle in der *DrBPhy*-Sequenz entsprechend der C-terminalen *PaBPhy*-PHY-Sequenz gewählt (s. Abbildung 20B). Die Übereinstimmung von drei aromatischen Aminosäureresten (*PaBPhy* W474, *DrBPhy* W483 und *HsPDE2A* F529) untermauerte das Sequenzraster aus dem strukturbasierten Linkeralignment von *PaBPhy* und *HsPDE2A*. Das initiale Fusionskonstrukt bestand demnach aus den Aminosäureresten 1-506 der *DrBPhy*-PAS-GAF-PHY-Domänen (PCD) und 553-941 von *HsPDE2A*.

Das *DrBPhy*-basierte Konstrukt zeigte eine bessere Expression; im Folgenden wird daher exemplarisch die Klonierung und Expression der *DrBPhy*-basierten Chimäre beschrieben, die als LAPD+2 (*light-activated phosphodiesterase*, Linkervariante +2; s. Abschnitt 3.2) bezeichnet wird.

3.1.2 Klonierung der Bakteriophytochrom-Phosphodiesterase-2A-Chimäre LAPD+2

Die Amplifikation von *DrBPhy*-PCD (AS 1-506; Uniprot BPHY_DEIRA) aus genomischer DNA des *Deinococcus-radiodurans*-Typstamms DSM 20539 (DSMZ, Braunschweig) wurde wegen des hohen GC-Gehaltes von 70% bei maximaler Annealingtemperatur von 72 °C mit 5% DMSO (Dimethylsulfoxid) in einer Zweischritt-PCR durchgeführt. Das Amplifikat *DrBPhy*-PCD wurde mit dem pET28c(+)-Vektor über die Restriktionsschnittstellen *Nde*//*Sall* kloniert (s. Abschnitt 6.4.2). Die katalytische *HsPDE2A*-Domäne (*HsPDE2A*-PDE; AS 553-941; Uniprot PDE2A_HUMAN) lag als cDNA-Klon vor (imaGenes GmbH, Berlin; s. Abschnitt 6.1). Um das chimäre Konstrukt LAPD+2 zu generieren, wurden das pET28c(+)-*DrBPhy*-PCD-Konstrukt und der PDE-cDNA-Klon (s.o.) in verschiedene Varianten von Fusion-PCR (Standard-PCR, *two-step PCR*, *primerless PCR*) eingesetzt. Mit keiner Strategie wurde ein Amplifikat erzielt, was vermutlich durch den hohen GC-Gehalt der DNA-Sequenz von *DrBPhy*-PCD bedingt war.

In einem alternativen Ansatz wurde die *DrBPhy*-PCD-Sequenz zunächst mit einem pET28c(+)-Vektor kloniert (*Nde*//*Sall*), wobei das 3'-Ende der *DrBPhy*-Sequenz über die Oligonukleotidprimer um das 5'-Ende der PDE-Sequenz erweitert wurde. Dieses 5'-Ende enthielt die Schnittstelle *Bsp1407I* (*BsrGI*), die über stille Mutation der Oligonukleotidprimer eingeführt worden war (stromaufwärts der *Sall*-Schnittstelle, s. Abschnitt 6.4.2). In einem zweiten Schritt wurde die PDE-Sequenz über Standard-PCR-Bedingungen amplifiziert, wobei dieses Insert mit den Schnittstellen *Bsp1407I* (*BsrGI*) (5'-Ende) und *Sall* (3'-Ende) flankiert wurde. Auch hier war die *Bsp1407I* (*BsrGI*)-Schnittstelle durch stille Mutation der Oligonukleotidprimer an das 5'-Ende der PDE-Sequenz angefügt worden (s. Abschnitt 6.4.2). In einem dritten Schritt wurde schließlich die Fusion der *DrBPhy*-PCD- und der PDE-Sequenz über Restriktion mit *Bsp1407I* (*BsrGI*)/*Sall* und Ligation realisiert. Subklonierung ermöglichte die Expressionsanalyse des Fusionskonstruktes LAPD+2 in unterschiedlichen Vektoren (pASK43(+), pBADM-30(+)) und *E.-coli*-Stämmen (CmpX13, BL21 (DE3), Rosetta (DE3)). Die Anreicherung von LAPD+2 wurde über

verschiedene N- und C-terminale Tags (6-facher His-Tag, Strep-Tag) versucht. Im Folgenden werden Rekonstitution (Chromophoreinbau) und Expressionstests von LAPD+2 beschrieben.

3.1.3 *In-vitro*-Chromophoreinbau in LAPD+2

Der vollständige Einbau von Biliverdin (BV) in das PCD-Modul ist Voraussetzung für quantitative biochemische und biophysikalische Analysen des funktionalen BPhy-Photorezeptors. Die intrinsische Lyase-Aktivität der GAF-Domäne [69] ermöglicht den autokatalytischen Einbau von freiem BV durch *DrBPhy* *in vitro* und *in vivo* [70]. Die Rekonstitution von gereinigten Holo-BPhys ist *in vitro* durch Zugabe eines BV-Überschusses im reduzierenden Milieu möglich [69]. Getestet wurde die *In-vitro*-Rekonstitution mit einer gereinigten Holo-LAPD+2-Probe, die durch einen schwachen Chromophor-Einbau charakterisiert war (s. Abschnitt 3.1.9; LAPD+2_C-Strep). 1,3 μM LAPD+2 wurden mit einem ~ 50 -fachen BV-Überschuss (70 μM Endkonzentration) und dem Reduktionsmittel TCEP (2 mM Endkonzentration) versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C wurde die Probe viermal gegen 500 ml Aufbewahrungspuffer (20 mM Tris·HCl, 20 mM NaCl; pH 8,0) dialysiert, um freies Biliverdin zu entfernen. Ein während der Dialyse ausgefallenes Präzipitat wurde durch einminütige Zentrifugation bei 16000 g und 4 °C abgetrennt und ein UV/vis-Spektrum aufgenommen (nicht gezeigt). Zwar wurde der Anteil an Holoprotein geringfügig gesteigert ($\sim 10\%$), doch die Menge von Holo-LAPD verringerte sich nach *In-vitro*-Rekonstitution um $\sim 30\%$ (Bestimmung der Proteinkonzentration über den isosbestischen Punkt bei A_{724} ; s. Abschnitt 2.7.2). Wegen des hohen Proteinverlustes im Dialysat wurde von einer *In-vitro*-Rekonstitution nach erfolgter Reinigung abgesehen. *In-vitro*-Rekonstitutionen mit kommerziellem Biliverdin können darüber hinaus präparative Verunreinigungen einführen, da Biliverdin aus mikrobieller Extraktion keine 100%ige Reinheit erreicht [227].

3.1.4 *In-vivo*-Rekonstitution von Holo-*DrBPhy*-PCD-Konstrukten mit Biliverdin in CmpX13-Zellen

Langfristig ist für biophysikalische Analysen eine homogene Proteinprobe zu erzielen, was *in vivo* durch die stereoselektive Synthese von Biliverdin ausgehend von δ -Aminolävulinsäure durch die Enzyme der Häm-Biosynthese und durch die Hämoxygenase gewährleistet wird (vgl. Abschnitte 1.2.5 & 1.4.2). Die Verwendung bakterieller Hämoxygenasen aus *Deinococcus radiodurans* (*DrBphO*) und

Synechocystis sp. (SsHO1) wurde zur Rekonstitution der Holo-DrBPhy-PCD mit BV in *E. coli* während der Expression von DrBPhy-WT beschrieben [64]. Zunächst wurde die Koexpression von natürlichem DrBPhy-WT (in pET28c(+)) und der Hämoxygenasen DrBphO (in pQE81) oder SsHO1 (in pKT270) [228] in 5-ml-*E.-coli*-Kultur getestet; alle drei *lac*-kontrollierten Expressionskassetten (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2) wurden mit 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) induziert. Dabei wurde der Expressionsstamm CmpX13 eingesetzt, der sich zur heterologen Überexpression von Photorezeptoren bewährt hatte [219]. Die Koexpression von pET28c(+)-DrBPhy-WT und pKT270-SsHO1 zeigte dabei gegenüber pQE81-DrBphO eine stärkere Grünfärbung des Expressionspellets, d.h. Chromophoranreicherung (Abbildung 21A). Gleichzeitig deutete die SDS-PAGE-Analyse der Koexpression von DrBphO und SsHO1 auf eine vergleichbare Expressionsstärke von DrBPhy-WT (Abbildung 21E). Die mangelnde BV-Synthese bei Koexpression von DrBphO könnte durch die gemeinsame Inkompatibilitätsgruppe des Replikationsursprungs von pET28c(+) und pQE81 (*colE1* bzw. *pBR322*) zu erklären sein. Daher wurde in folgenden *In-vivo*-Rekonstitutionen von Holo-BPhy-PDE-Fusionskonstrukten die cyanobakterielle Hämoxygenase SsHO1 verwendet.

Die Optimierung der Chromophoranreicherung bei Koexpression von BPhy-Konstrukten mit pKT270 erfolgte anhand der isolierten DrBPhy-PCD (DrBPhy_1-506). Koexpression von pET28c(+)-DrBPhy_1-506 (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2) und pKT270-SsHO1 in CmpX13 bei 30 °C und 115 U min⁻¹ im 5-ml-Maßstab über Nacht resultierte in einem weiß-gelben *E.-coli*-Pellet nach Zentrifugation (nicht gezeigt). Das deutete auf eine fehlende Bildung des grünen BV hin. Die Zugabe von 0,5 mM δ -Aminolävulinsäure, einer Vorstufe der Häm-Biosynthese, zur Expressionskultur bei gleichzeitiger Änderung der Expressionsbedingungen ermöglichte die BV-Akkumulation: Koexpression der DrBPhy-PCD und SsHO1 bei 16 °C und 225 U min⁻¹ über Nacht ergab eine Akkumulation des Chromophors (Grünfärbung des Expressionspellets in Doppelbestimmung; Abbildung 21B, rechts); diese Expressionsbedingungen (16 °C und 225 U min⁻¹ über Nacht) wurden für alle folgenden Ansätze verwendet. Die Kontrollen, DrBPhy-PCD ohne SsHO1 (Abbildung 21B, links) und SsHO1 ohne DrBPhy-PCD (nicht gezeigt), waren wie erwartet nicht grün gefärbt. Letztere Kontrolle deutet auf eine ausschließliche Anreicherung in der PCD und auf eine Degradation von freiem BV hin.

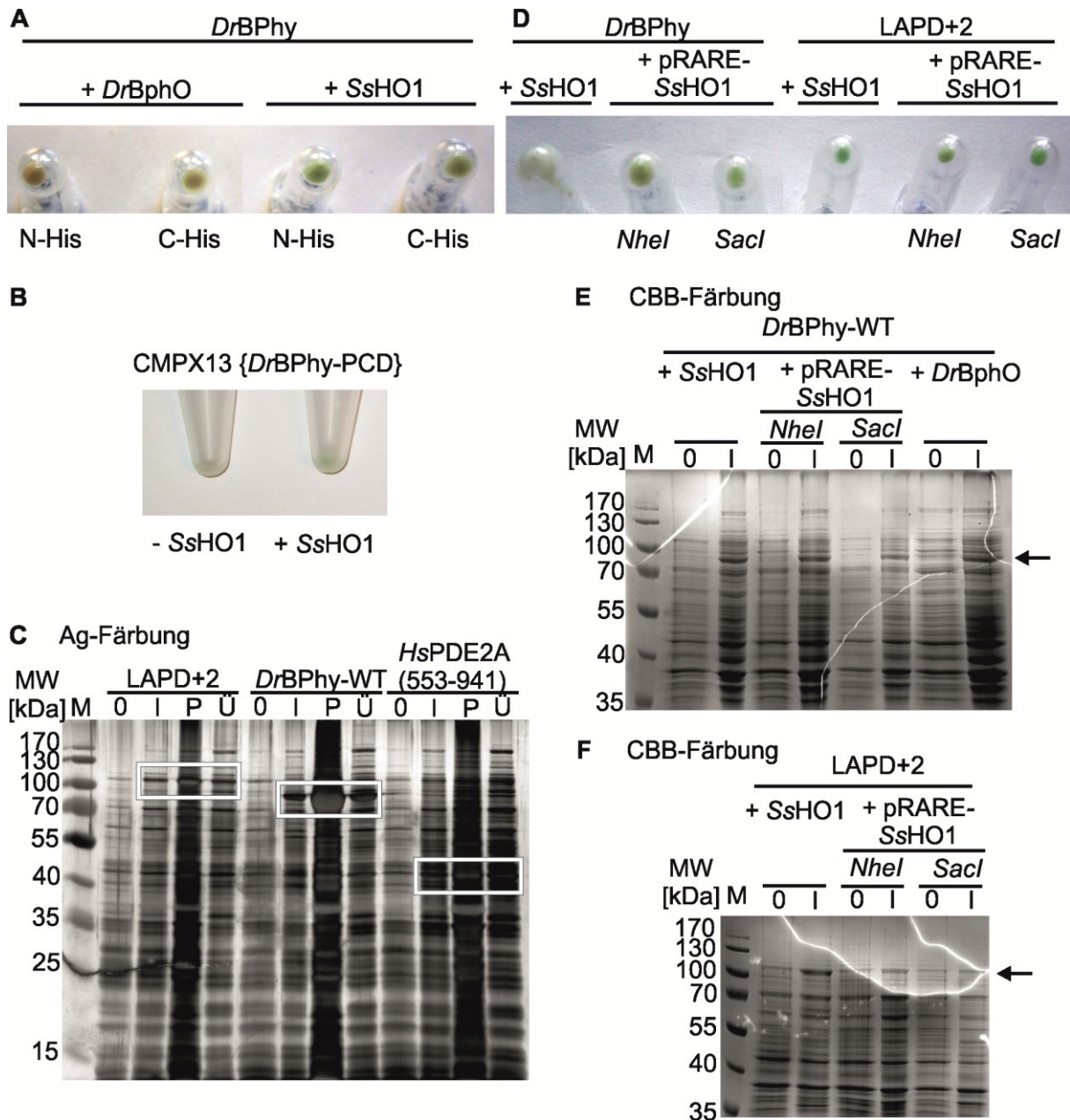


Abbildung 21. In-vivo-Rekonstitution von Holo-*DrBPhy*-PCD-Konstrukten mit Chromophor während Expression im 5-ml-Maßstab. **A.** CmpX13-Zellpellets nach Koexpression von pET28c(+)-*DrBPhy*-WT und pQE81-*DrBphO* oder pKT270-*SsHO1* im Expressionstest; *DrBPhy*-WT-Konstrukte wurden mit N- oder C-terminalem His-Tag exprimiert. **B.** Chromophoreinbau in *DrBPhy*-PCD (pET28c(+)-Kontext) ohne und mit Koexpression von pKT270-*SsHO1* im CmpX13-Zellpellet (Expressionstest). **C.** SDS-PAGE-Analyse von Expressionstests mit LAPD+2, *DrBPhy*-WT und *HsPDE2A*-PDE in Rosetta (DE3) (jeweils im pET28c(+)-Kontext); weiße Quader markieren erwartetes Molekulargewicht [kDa]. **D.** CmpX13-Zellpellets nach Koexpression von pET28c(+)-*DrBPhy*-WT oder pET28c(+)-LAPD+2 und pKT270-*SsHO1* oder pRARE-*SsHO1* (mit *NheI* oder *SacI* konstruiert) im Expressionstest. **E.** SDS-PAGE-Analyse von Expressionstests mit pET28c(+)-*DrBPhy*-WT und pKT270-*SsHO1* oder pRARE-*SsHO1* (mit *NheI* oder *SacI* konstruiert) oder pQE81-*DrBphO* in CmpX13; der Pfeil markiert die Expressionsbanden bei ~80 kDa. **F.** SDS-PAGE-Analyse von Expressionstests mit pET28c(+)-LAPD+2 und pKT270-*SsHO1* oder pRARE-*SsHO1* (mit *NheI* oder *SacI* konstruiert); der Pfeil markiert die Expressionsbanden bei ~100 kDa. (SDS-PAGE-Proben: 0 = Zellpellet vor Induktion der Expression; I = Zellpellet nach erfolgter Expression; P = Pellet, Lysat nach

Zentrifugation; Ü = Überstand, Lysat nach Zentrifugation; CBB = Coomassie Brilliant Blue; M = Marker; MW = Molekulargewicht).

3.1.5 Koexpression von pKT270-SsHämoxygenase 1 und tRNA-Helferplasmid aus Rosetta (DE3)

Der Expressionsstamm Rosetta (DE3) hatte sich im 5-ml-Maßstab durch eine starke Überexpression von *DrBPhy*-WT im pET28c(+)-Kontext (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2) ausgezeichnet (Abbildung 21C); prominente Banden mit Molekulargewichten von LAPD+2 (~100 kDa) und PDE-Domäne (~45 kDa) deuteten ebenso auf starke Expression hin. Das Prinzip beruht auf der Koexpression seltener tRNAs durch das Helferplasmid pRARE (Kodons: AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) [229,230]. Jedoch tragen sowohl pRARE als auch pKT270-SsHO1 (BV-Synthese) eine Chloramphenicol-Resistenz, weswegen eine Koexpression beider Plasmide in CmpX13 oder Rosetta nicht kompatibel war. Um beide Plasmid-Funktionen in einem BPhy-Expressionsstamm zu testen, wurde die durch den T5-lac-Promotor kontrollierte SsHO1-Expressionskassette aus pKT270 in pRARE inseriert. Die entsprechende Restriktionsklonierung erforderte zunächst die vollständige Rekonstruktion der pKT270-Sequenz aus den Vorläufersequenzen pACYC184 und dem Typstamm-Genom von *Synechocystis* sp. [228] (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2). Die pRARE-Sequenz ist jedoch wegen kommerzieller Nutzung nicht öffentlich, weshalb die SsHO1-Expressionskassette in zwei verschiedenen Ansätzen über je einfache bekannte Schnittstellen (*NheI* bzw. *SacI*) in pRARE eingefügt wurde. Diese sind gemäß schematischer Plasmidkarte wahrscheinlich hinreichend weit von essentiellen Plasmid-Elementen entfernt, um bei Insertion keine Plasmidfunktion zu stören (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2). Die vereinigten Plasmide mit pRARE-Rückgrat und pET28c(+)_LAPD+2 wurden im 5-ml-Maßstab in CmpX13 koexprimiert (Induktion über 1 mM IPTG). Die Grünfärbung, d.h. die Chromophoranreicherung der zugehörigen Expressionspellets, war mit der Koexpression von pKT270-SsHO1 vergleichbar (Abbildung 21D); die Funktionalität der SsHO1-Expressionskassette wurde also im pRARE-Kontext konserviert. Die SDS-PAGE-Analyse der Koexpression von vereinigttem Plasmid zeigte weder für *DrBPhy*-WT noch für LAPD+2 eine höhere Expressionsrate gegenüber pKT270-SsHO1 (Abbildung 21D&E). Da durch Koexpression des Konstrukts pRARE_SsHO1 keine Verbesserung der Expression erzielt wurde, wurde für alle folgenden *In-vivo*-Rekonstitutionen pKT270-SsHO1 beibehalten.

3.1.6 Expression von LAPD+2 im pET28c(+)-Vektor

Die Koexpression von pET28c(+)_LAPD+2 und pKT270-SsHO1 in CmpX13 wurde zur Reinigung vom 5-ml- auf den 500-ml-Maßstab übertragen (Induktion mit 1 mM IPTG). Über den N-terminalen His-Tag (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2) wurde LAPD+2 mittels Co^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie angereichert und mit Stufenelution per Imidazol-Überschuss (200 mM) isoliert. Die Elutionsfraktion zeigte im Western Blot (α -His-Tag; s. Abschnitt 2.6.3) eine Proteinbande des theoretisch erwarteten Molekulargewichts (~ 100 kDa) von LAPD+2 (Abbildung 22A). In der Probe überwoogen anteilig jedoch N-terminale Fragmente translational abortiven oder proteolytischen Ursprungs mit den Molekulargewichten ~ 55 und ~ 40 kDa in der Hauptfraktion (F2+F3).

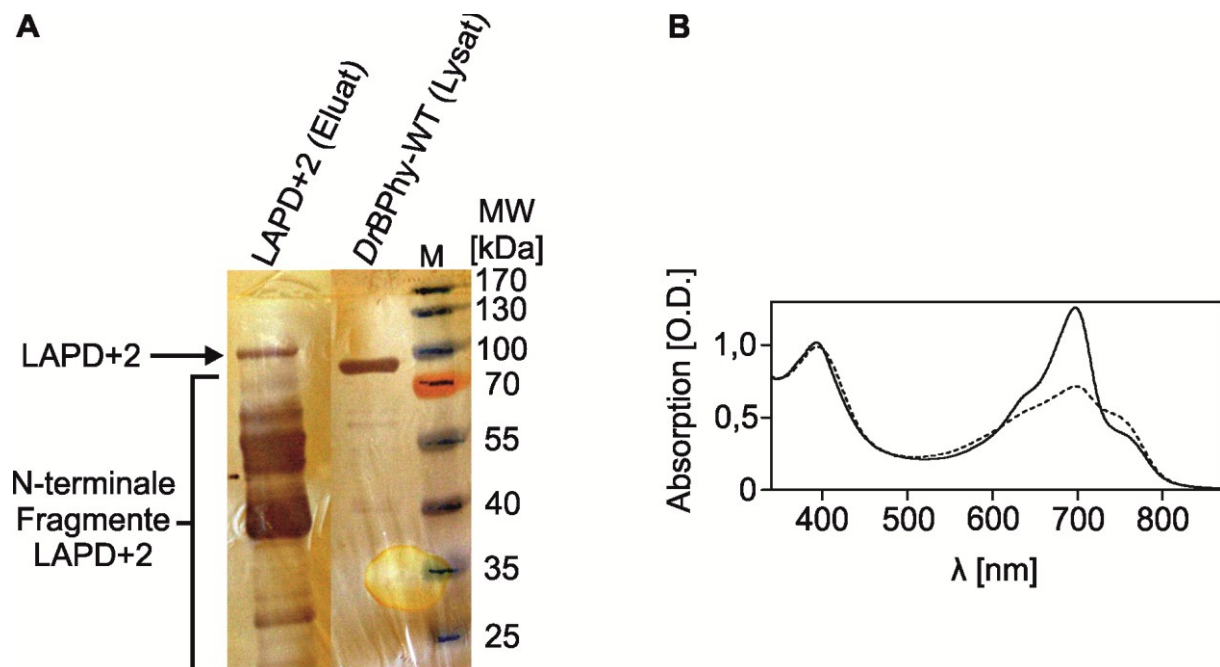


Abbildung 22. Expression im 500-ml-Maßstab von LAPD+2 im pET28c(+)-Vektor in CmpX13-Zellen. **A.** Identifikation von LAPD+2 mit N-terminalem His-Tag im Western Blot (α -His-Tag); mit gereinigtem DrBPhy-WT als Positivkontrolle. Die Analyse der LAPD+2-Elutionsfraktion zeigt eine Bande bei ~ 100 kDa (\triangleq LAPD+2) neben starker Verunreinigung durch N-terminale Fragmente. **B.** UV-vis-Spektrum des Eluats nach der Expression von pET28c(+)_LAPD+2_N_His, dunkeladaptiert (durchgezogene Kurve) und mit satuerendem weißem Kaltlicht beleuchtet (gestrichelte Kurve).

Die vereinigte und konzentrierte Hauptfraktion zeigte ein BPhy-Spektrum mit Soret-Bande ($\lambda_{\text{max}} \sim 400$ nm), P_r - ($\lambda_{\text{max}} = 700$ nm) und P_{fr} -Anteilen ($\lambda_{\text{max}} = 751$ nm). Die teilweise Ausbildung des P_{fr} -Zustandes ist durch anfänglich nicht-stringente Dunkelbedingungen bei einer Testreinigung zu erklären. Unter Weißlicht wurde der

P_{fr} -Zustand ($\lambda_{max} = 751 \text{ nm}$) akkumuliert (Abbildung 22B) [70]. Die UV/vis-Spektren der überwiegend N-terminalen LAPD+2-Fragmente standen in guter Übereinstimmung mit der photochemischen Charakterisierung von PCD-Fragmenten aus *DrBPhy* [110]. Das PAS-GAF-Tandem von ~34 kDa ohne PHY-Domäne war mit unvollständiger Photochemie durch eingeschränkte P_{fr} -Bildung beschrieben worden. Im Gegensatz dazu war das PAS-GAF-PHY-Konstrukt von ~55 kDa photochemisch vollständig funktional. Das ~40 kDa-Fragment der Hauptfraktion müsste demnach durch eine defiziente Photokonversion charakterisiert gewesen sein, das ~55 kDa-Fragment durch eine vollständige (SDS-PAGE; Abbildung 22A). Das Verhältnis von $A_{700}/A_{751} > 1$ bei Lichtanregung ist durch eine Mischung beider Fragmente zu erklären. Da der Anteil des ~40 kDa-Fragments überwiegt (stärkste Intensität im Western Blot), ist die Netto- P_{fr} -Bildung unvollständig. Bei funktionalem Konstrukt wäre auch bei Weißlicht ohne roten Interferenzfilter (690 nm) erwartungsgemäß $A_{700}/A_{751} < 1$.

3.1.7 *E.-coli*-adaptierte Kodonbenutzung bei LAPD+2-Expression

Die N-terminalen Fragmente der Hauptfraktion (Abbildung 22A) könnten trotz Verwendung eines Breitband-Protease-Hemmers auf aktive Proteasen zurückzuführen sein. Das wird durch ähnliche proteolytische Fragmente von *DrBPhy*-WT des Molekulargewichts ~55, ~40 und ~25 kDa untermauert, die allerdings durch tierisches Trypsin erzeugt wurden [110]. Für abortive PCD-Fragmente aufgrund unvollständiger Translation spricht, dass die Fragmente bis zu einem Molekulargewicht von ~55 kDa stark, größere Fragmente schwach exprimiert wurden. Das ~55-kDa-Fragment entspricht in etwa der Größe der BPhy-PCD, d.h. des LAPD+2-Konstrukts ohne C-terminale PDE-Domäne. Dieser Befund könnte durch mangelnde Expression der humanen PDE2A-Sequenz in *E. coli* erklärbar sein. Daher wurde die humane PDE2A-Sequenz im pET28c(+)-LAPD+2-Konstrukt (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2) durch eine Variante ausgetauscht, deren Kodonbenutzung an *E. coli* adaptiert war (als pMA-T-*HsPDE2A*-553-941 synthetisiert; Mr. Gene; s. Abschnitt 6.4.1): Die *HsPDE2A*-553-941-Sequenz wurde mit den Restriktionsenzymen *BsrGI*/*Sall* aus pMAT-T ausgeschnitten und im Plasmid pET28c(+), das die *DrBPhy*-1-506-Sequenz bakteriellen Ursprungs enthielt (s. Abschnitt 6.1), über erneute Restriktion mit *BsrGI*/*Sall* und Ligation eingebaut (s. Abschnitt 6.4.2). Die anschließende Expression im 500-ml-Maßstab (mit pKT270-*SsHO1* und IPTG-Induktion) und die Affinitätschromatographie mit Co^{2+} -NTA erbrachten keine erhöhte Ausbeute an LAPD+2 (Abbildung 23A; ~100 kDa). Der Anteil an Fusionsprotein war wie bei

Expression von LAPD+2 mit humaner PDE-Sequenz in *E. coli* vergleichbar gering. Wie die Zn-induzierte Fluoreszenz zeigt (s. Abschnitt 2.6.2), waren die starken Verunreinigungen N-terminale Fragmente (Abbildung 23B). Die Expression der *E.-coli*-adaptierten LAPD+2-Sequenz im Kontext verschiedener Expressionsvektoren wird im Folgenden beschrieben.

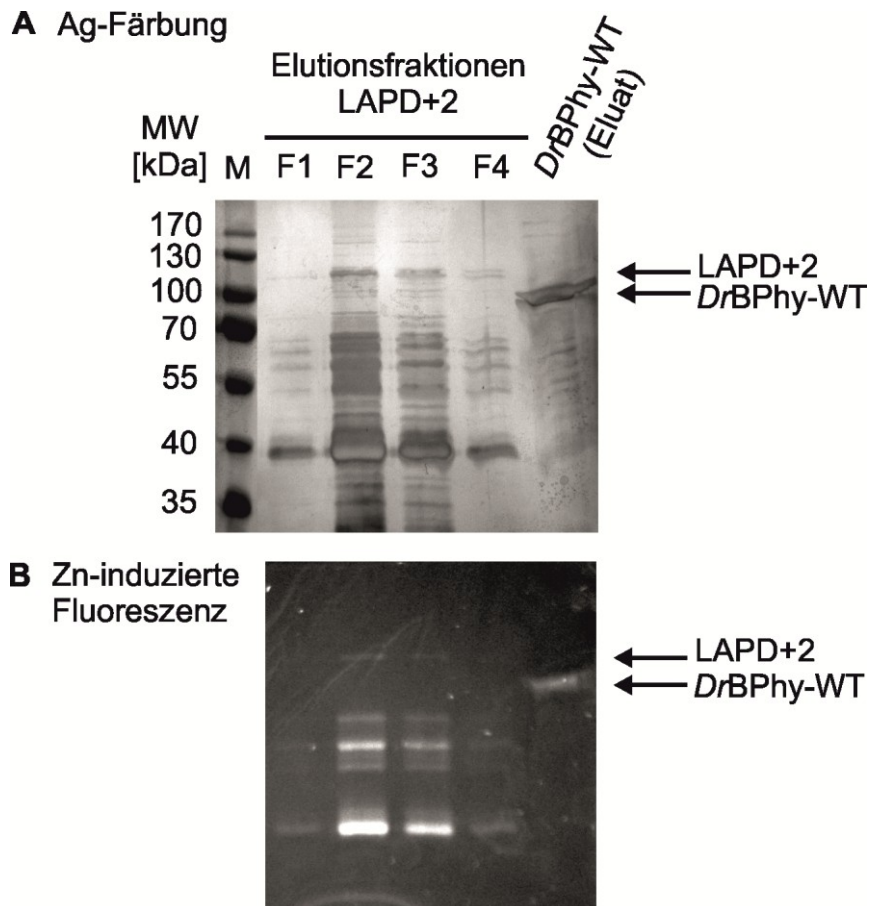


Abbildung 23. Expression von pET28c(+)-LAPD+2_N-His nach *E.-coli*-Kodonoptimierung (*HsPDE2A* 553-941) in CmpX13-Zellen. A. SDS-PAGE-Analyse (Silber (Ag)-Färbung) der Koexpression von pET28c(+)-LAPD+2_N-His und pKT270_SsHO1 im 500-ml-Maßstab nach Reinigung mit Co^{2+} -NTA-Säule. **B.** Zn-induzierte Fluoreszenz zeigt eine schwache Bande bei ~100 kDa (\triangleq LAPD+2) neben starker Verunreinigung durch N-terminale Fragmente; mit gereinigtem DrBPhy-WT als Positivkontrolle. (SDS-PAGE-Proben: F = Elutionsfraktionen).

3.1.8 Expression von LAPD+2 im pBADM-30(+)-Vektor

Der pBADM-30(+)-Expressionsvektor enthält den araBAD-Promotor des ara-Operons (Ara_Binose) und das Gen für den zugehörigen positiven und negativen Regulator araC. Die Expression von bakteriellen Zielproteinen wurde bis zu ~1200-fach durch Arabinose induziert, wobei die Expressionsstärke über 5 Größenordnungen der

Arabinose (ARA)-Konzentration moduliert wurde (0,00002-0,2% ARA (m/V)) [231]. Die über ARA-Konzentration titrierbare Expressionsstärke des pBADM-30(+)_LAPD+2-Konstruktes (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2) war bei konstanter Induktion der SsHO1-Expression mit 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) an der Grünfärbung des Expressionspellets im 5-ml-Maßstab abzulesen (Abbildung 24A). Für die Expression im 500-ml-Maßstab wurde eine ARA-Konzentration von 0,2% gewählt; ab dieser Konzentration trat eine Sättigung der Grünfärbung ein, d.h. vermutlich eine Sättigung der LAPD+2-Expression. Interessanterweise ergab die Koexpression von pKT270-SsHO1 mit und ohne IPTG-Induktion eine gleich intensive Grünfärbung des Expressionspellets (Abbildung 24B). Die basale SsHO1-Expression aufgrund Promotordurchlässigkeit reichte für eine gesättigte BV-Synthese aus. Reinigung über Co^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie und N-terminalen His-Tag führte auch hier zu einer Probe mit ~100-kDa-Bande in der SDS-PAGE-Analyse, die aber durch N-terminale Fragmente (Abbildung 24D&E: Zn-Assay) stark verunreinigt war.

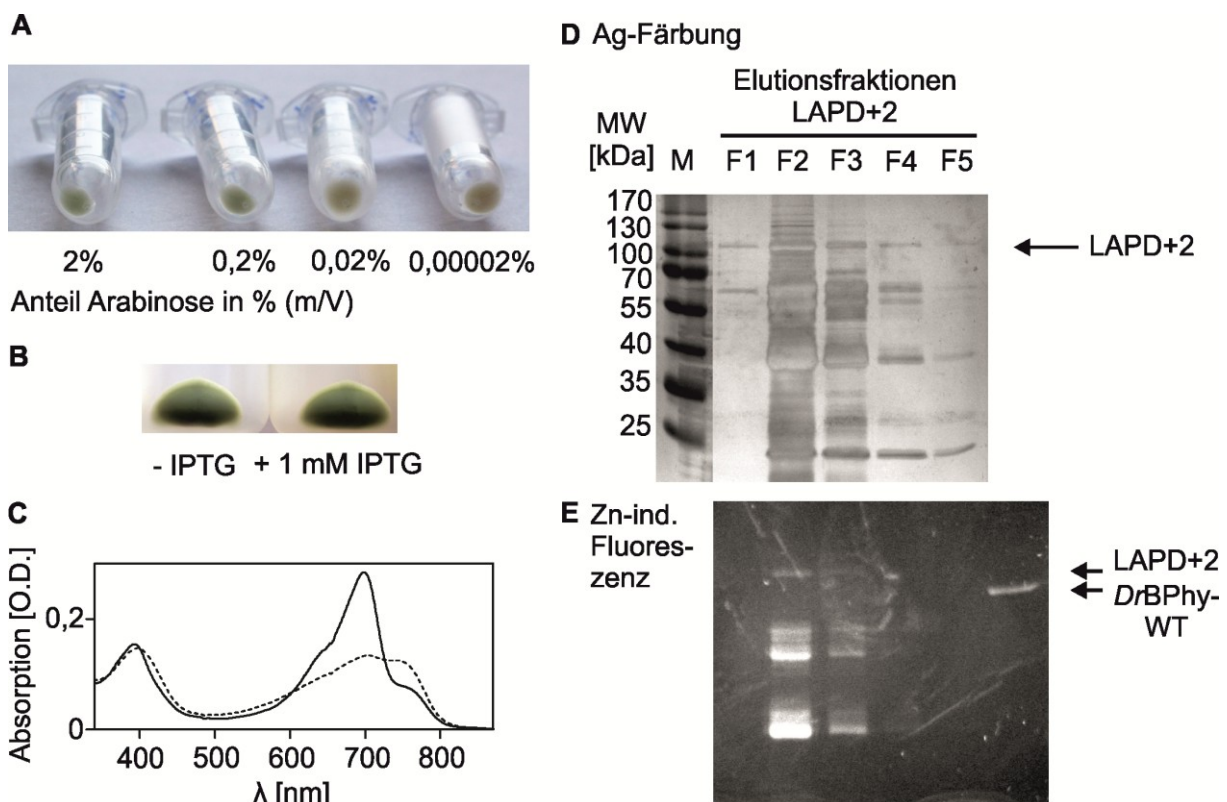


Abbildung 24. Expression von LAPD+2_N-His in pBADM-30(+) in CmpX13-Zellen. **A.** Pelletierte CmpX13-Zellen im 5-ml-Expressionstest nach Induktion der Expression von pBADM-30(+)_LAPD+2_N-His über eine ARA-Konzentrationsreihe (0,00002-2%). **B.** CmpX13-Zellen nach Expression von pBADM-30(+)_LAPD+2_N-HIS im 500-ml-Maßstab ohne und mit Induktion von pKT270 mit 1 mM IPTG. **C.** UV/vis-Spektrum des Eluats nach Reinigung von LAPD+2_N-His über eine Co^{2+} -NTA-Säule, dunkeladaptiert (durchgezogene Linie) und mit saturierendem Rotlicht (690 nm,

Kaltlichtquelle mit IF-Filter) adaptiert (gestrichelte Kurve). **D.** SDS-PAGE-Analyse der LAPD+2_N_HIS-Reinigung nach Expression von pBADM-30(+)_LAPD+2_N-His im 500-ml-Maßstab, Ag-Färbung. Die Analyse der Elutionsfraktionen zeigt eine Bande bei ~100 kDa (\triangleq LAPD+2) neben starker Verunreinigung durch N-terminale Fragmente. **E.** Zn-induzierte Fluoreszenz; mit gereinigtem DrBPhy-WT als Positivkontrolle.

Die Probe war jedoch photoaktiv (F2+F3) (Abbildung 24C). Auch hier war im photostationären Gleichgewicht trotz Beleuchtung mit definiertem 690-nm-LED-Licht $A_{700}/A_{751} > 1$. Dieses Verhältnis war vermutlich durch photochemisch defiziente Fragmente von < 55 kDa begründet. Die Teilausbildung des P_{fr} -Zustands lag vermutlich an der nicht strikten Dunkelheit bei der Testreinigung.

3.1.9 Expression von LAPD+2 im pASK43(+)-Vektor

LAPD+2 mit C-terminalem Strep-Tag

pASK-Vektoren stellen die heterologe Expression von Proteinen in *E. coli* unter die transkriptionell strenge Kontrolle des *tetA*-Promotors über den *tet*-Repressor und -Operator: Durch Bindung von Anhydrotetracyklin (AHT) in geringer Konzentration wird die Expression stark induziert. Der pASK43(+)-Vektor verfügt zusätzlich über einen C-terminalen Strep-Tag [232], welcher die Reinigung von Proteinen über die hochspezifische Bindung einer Strep-Tactin-Säule ermöglicht [233]. Ein pASK43(+)_LAPD+2-Konstrukt mit C-terminalem Strep-Tag wurde kloniert (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2), und eine Expressionsanalyse im 5-ml-Maßstab ergab, dass sich die geeignete AHT-Konzentration zur Induktion im Bereich zwischen 0,2 und 0,4 $\mu\text{g/ml}$ befand (Abbildung 25A). Eine weitere Erhöhung der Induktor-Konzentration ergab keine intensivere Grünfärbung, sondern hatte im Gegenteil durch die antibiotische Wirkung des Tetracyklin-Derivats AHT eine Abnahme der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) sowie eine Reduktion der Grünfärbung zur Folge. Im 500-ml-Maßstab wurde pASK43(+)_LAPD+2_C-Strep mit pKT270_SsHO1 exprimiert (Induktion mit 0,2 und 0,4 $\mu\text{g/ml}$ AHT bzw. 1 mM IPTG; Abbildung 25B). Das Ergebnis war eine deutliche Überexpression der erwarteten ~100-kDa-Spezies im aufgeschlossenen Zellpellet (Abbildung 25C: „L“; 25D: Zn-Färbung) sowie in der löslichen Fraktion nach Zentrifugation (Abbildung 25C: „Ü“). Die anschließende Reinigung über Strep-Tactin-Sepharose ergab eine reine LAPD+2-Probe geringer Ausbeute (Abbildung 25C), und die Zn-induzierte Fluoreszenz bestätigte die ~100-kDa-Spezies über eingebautes BV als LAPD+2 (Abbildung 25D). Im UV/vis-Spektrum der konzentrierten

Elutionsfraktionen war neben der Absorptionsbande bei 280 nm (A_{280}) jedoch nur eine schwache Chromophorabsorption (P_r , P_{fr} , Soret-Bande) zu sehen (nicht gezeigt). A_{280} ist durch die Absorption aromatischer Aminosäurereste von Proteinen bedingt, bei Phytochromen auch durch die BV-Absorption bei 280 nm.

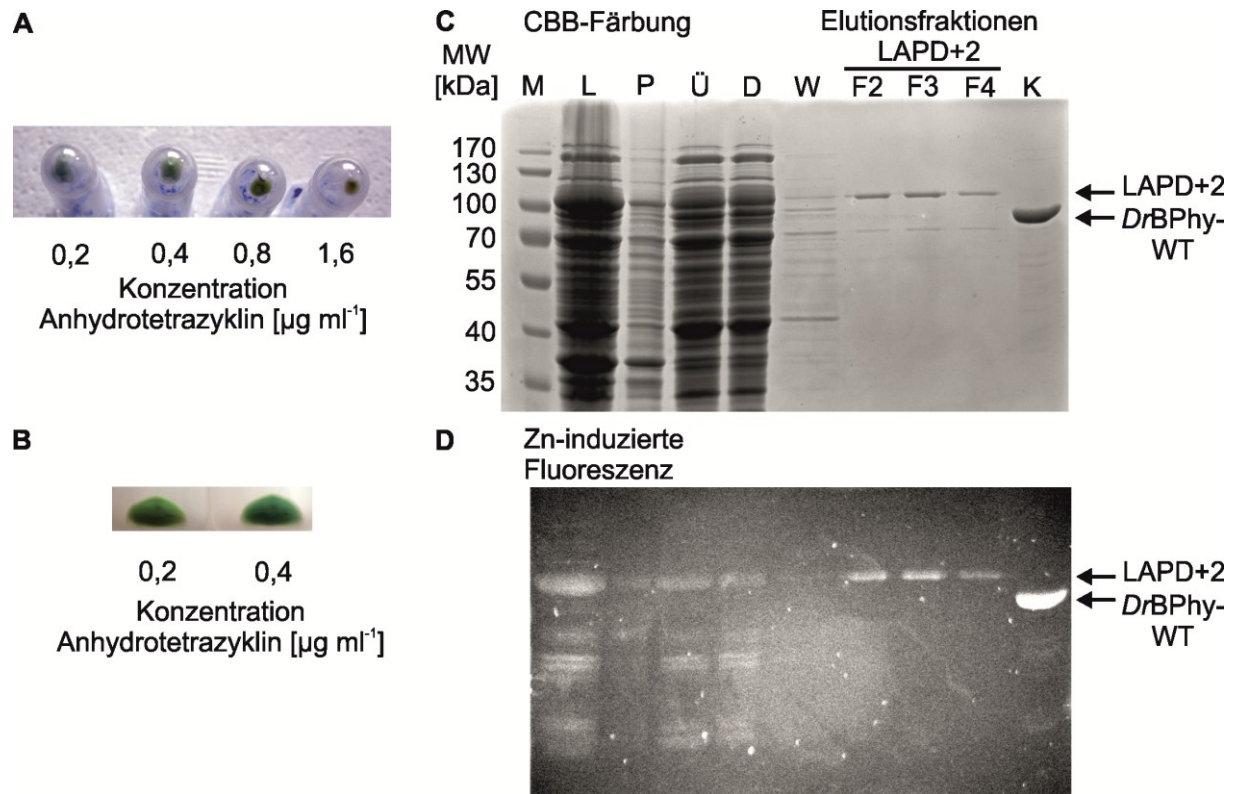


Abbildung 25. Expression von pASK43(+)_LAPD+2_C-Strep in CmpX13-Zellen. **A.** CmpX13-Zellpellets aus 5-ml-Expressionstests mit pASK43(+)_LAPD+2_C-Strep und pKT270_SsHO1 nach Induktion durch Anhydrotetracyclin (AHT) (Konzentrationsreihe: 0,2-1,6 $\mu\text{g ml}^{-1}$) bzw. 1 mM IPTG. **B.** CmpX13-Zellpellets aus Expression von pASK43(+)_LAPD+2_C-Strep und pKT270_SsHO1 im 500-ml-Maßstab nach Induktion mit 0,2 und 0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ AHT bzw. 1 mM IPTG. **C.** SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von LAPD+2_C-Strep über eine Strep-Tactin-Säule nach Expression im pASK43(+)-Kontext im 500-ml-Maßstab mit pKT270_SsHO1, CBB-Färbung: Die Analyse der Elutionsfraktionen zeigt eine Bande bei ~100 kDa (\cong LAPD+2). **D.** Zn-induzierte Fluoreszenz; mit gereinigtem DrBPhy-WT als Positivkontrolle. (SDS-PAGE-Proben: L = Lysat, P = Pellet, Ü = Überstand, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, K = Kontrolle).

LAPD+2 mit C-terminalem His-Tag

Aufgrund der deutlichen Überexpression wurde die Reinigung von LAPD+2 mit dem pASK43(+)-System optimiert (s. Abbildung 25). Zunächst wurde ein analoges pASK43(+)_LAPD+2-Konstrukt mit einem alternativen C-terminalen His-Affinitäts-Tag generiert (vgl. Abschnitte 5.3 & 5.4.2). Die entsprechende Expression mit pKT270_SsHO1 ergab nach Induktion mit 0,2-0,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ AHT und 1 mM IPTG ein

stark grün gefärbtes CmpX13-Pellet (Abbildung 26A). Nach Lyse zeigte sich in der SDS-PAGE-Analyse eine deutliche Bande bei ~100 kDa (Abbildung 26C: „L“), wobei LAPD+2 nach Zentrifugation ebenso in der löslichen Fraktion vorhanden war (Abbildung 26C: „Ü“). Die Hauptfraktion zeigte nach Reinigung über eine Co⁺²-NTA-Säule mit Stufenelution (200 mM Imidazol) wenige Verunreinigungen (Abbildung 26C: „F2-4“), wobei diese N-terminale Fragmente waren (Abbildung 26D: Zn-Färbung). Die Ausbeute wurde erheblich gesteigert (~2 mg/L Expressionskultur).

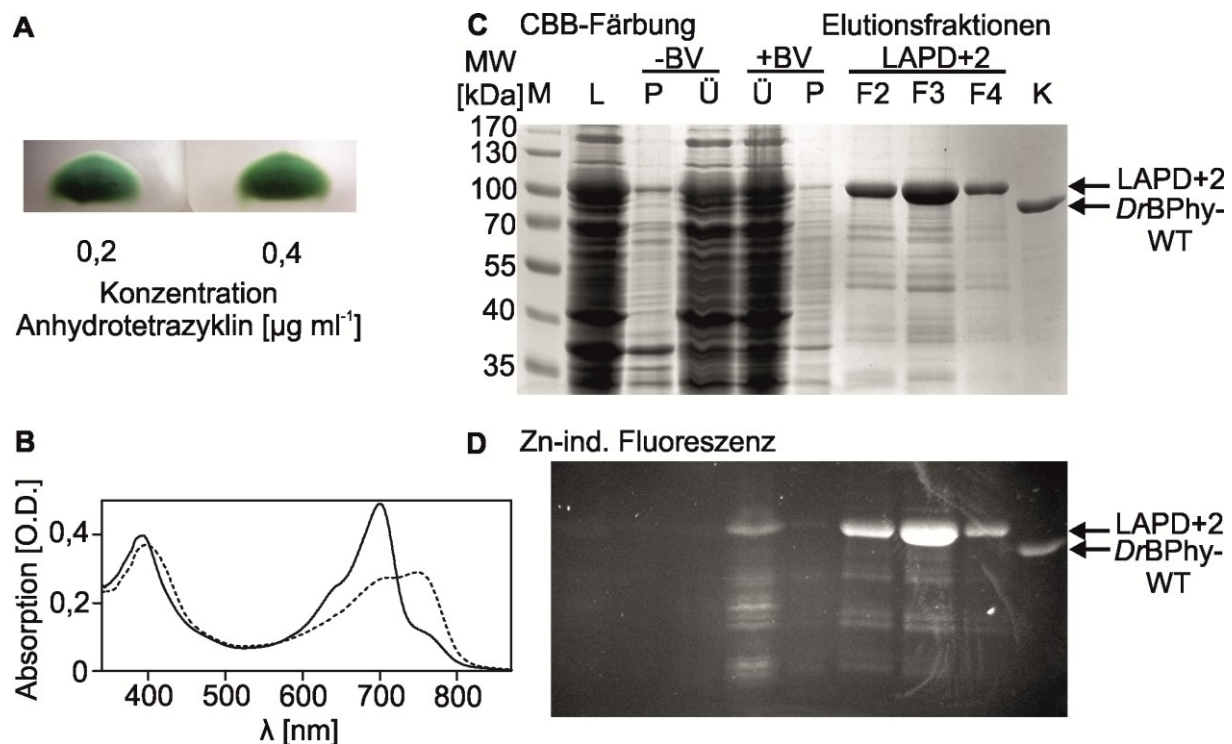


Abbildung 26. Reinigung von LAPD+2_C-His nach Expression im pASK43(+)-Kontext in CmpX13. **A.** CmpX13-Pellets nach Expression von pASK43(+)_LAPD+2_C-His mit pKT270_SsHO1 im 500-ml-Maßstab und Induktion mit 0,2 und 0,4 µg ml⁻¹ AHT bzw. 1 mM IPTG. **B.** UV/vis-Absorptionsspektrum von gereinigter LAPD+2_C-His; mit saturierendem Fernrotlicht adaptiert (Kaltlichtquelle mit 750-nm-Interferenzfilter; durchgezogene Linie) und mit saturierendem Rotlicht adaptiert (Kaltlichtquelle mit 690-nm-Interferenzfilter; gestrichelte Linie). **C.** SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von LAPD+2_C-His über eine Co²⁺-NTA-Säule nach Expression im pASK43(+)-Kontext im 500-ml-Maßstab mit pKT270_SsHO1, CBB-Färbung: Die Analyse der Elutionsfraktionen zeigt eine deutliche Bande bei ~100 kDa (≅ LAPD+2). **D.** Zn-induzierte Fluoreszenz; mit gereinigtem DrBPhy-WT als Positivkontrolle. Die Ausbeute an LAPD+2_C-His betrug ~2mg/L Expressionskultur. (SDS-PAGE-Proben: L = Lysat, P = Pellet, Ü = Überstand, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, K = Kontrolle, -/+BV = ohne/mit Rekonstitution von Holo-LAPD+2 mit Biliverdin-Überschuss im Lysat).

Das UV/vis-Spektrum der LAPD+2-Probe zeigte die charakteristische Signatur des parentalen *DrBPhy*-WT. Durch Bestrahlung mit R- und FR-Licht wurde der photoaktive P_{fr} bzw. P_r -Zustand akkumuliert (Abbildung 26B). Das Verhältnis von Q (A_{700})- zu Soret (A_{400})-Absorptionsbande von $\sim 1,3$ war im Vergleich zu den *DrBPhy*-Spektren in der Literatur niedrig (vgl. Q/Soret $\sim 2,7$ [64,70]). Das Verhältnis kann nur teilweise mit den nicht-strikten Dunkelbedingungen einer Testreinigung erklärt werden, die zu einer partiellen Ausbildung des P_{fr} -Zustands führten. Bezüglich der Inkorporation von BV wurde der Anteil an Holoprotein im Überstand nach Rekonstitution mit BV-Überschuss (100 μ M BV; 1 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert) erhöht (Abbildung 26C&D: „Ü ± BV“). Der gesteigerte BV-Einbau könnte im Vergleich zur ineffizienten *In-vitro*-Rekonstitution im Dialysat (s. Abschnitt 3.1.3) an geeigneten Bedingungen für die Lyase-Reaktion im Lysat liegen. Die etablierte Expressions- und Reinigungsvorschrift wurde für alle folgenden Konstrukte verwendet.

3.2 Charakterisierung von LAPD *in vitro*

Die enzymatische Charakterisierung von photochemisch intakter LAPD+2 zeigte im dunkel- und lichtadaptierten Zustand eine basale konstitutive PDE-Aktivität (s. Abschnitt 3.3.1; Abbildung 32A); die Bestimmung der Enzymaktivität der Linkervarianten erfolgte durch einen HPLC-basierten PDE-Assay (s. Abschnitt 2.6.4). Die enzymatische Aktivität bestimmter homodimerer Signalrezeptoren hängt von der Länge eines helikalen Linkers zwischen Sensor- und Effektormodulen ab [115,137,234]. Zwecks Analyse der Linkerfunktion bei der Signaltransduktion zwischen Photosensor (PCD) und Effektor (PDE) wurden analog Linkervarianten von LAPD+2 per ortsspezifischer Mutagenese im pASK43(+)-Kontext hergestellt. Insertions- und Deletionsmutanten unterschieden sich in der Linkerlänge durch Addition bzw. Subtraktion von einzelnen Aminosäureresten (Abbildung 32B&C). Aus der Analyse der Linkervarianten ging das Konstrukt LAPD(0) als erste funktionale LAPD hervor, die aus der Deletion von zwei Aminosäureresten in LAPD+2 resultierte (*DrBPhy* 1-506 + *HsPDE2A* 555-941; s. Abschnitt 5.3). Ferner hatte eine Testexpression im *E.-coli*-Stamm BL21 (DE3) zusammen mit pKT270_SsHO1 im 500-ml-Maßstab bei etablierter Reinigungsprozedur eine LAPD+2-Probe geringerer Ausbeute (0,6 mg/L Expressionskultur), aber höherer Reinheit ergeben (Bedingungen wie in Abschnitt 3.1.9). Daher wurden die Linkervarianten (LAPD-4 bis LAPD+7) in BL21 heterolog überexprimiert, gereinigt (Abbildung 27A) und photochemisch charakterisiert. Durch Koexpression von pASK43(+)_LAPD_C-His sowie pKT270_SsHO1 im 500-ml-Maßstab und Reinigung über eine Co^{2+} -NTA-Säule wurde eine Ausbeute von ~1mg/L Expressionskultur an funktionaler LAPD erzielt. LAPD inkorporierte wie LAPD+2 autokatalytisch BV (Abbildung 27B) und zeigte die charakteristische UV/vis-spektroskopische BPhy-Signatur und P_r/P_{fr} -Photochemie unter R- und FR-Bestrahlung (690- bzw. 750-nm-Licht) (Abbildung 27C). Die quantitative Ausbildung des P_r -Grundzustands ohne nennenswerte P_{fr} -Schulter ist auf eine Expression und Reinigung bei Dunkelheit und schwachem Grünlicht zurückzuführen. Die spektroskopische und enzymatische Charakterisierung von LAPD wird im Folgenden beschrieben.

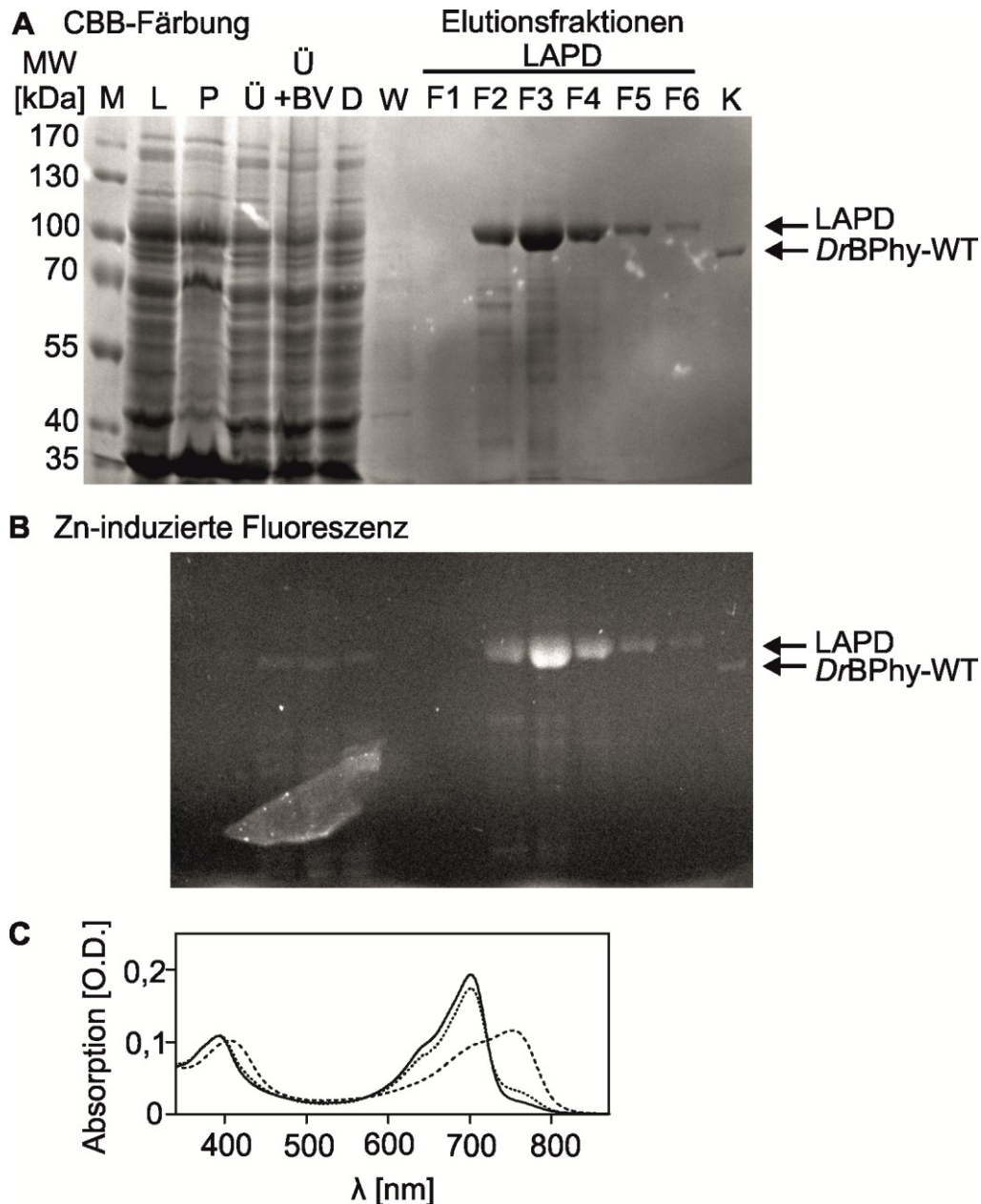


Abbildung 27. Reinigung von LAPD+2_C-His nach Expression im pASK43(+)-Kontext in BL21(DE3)-Zellen. **A.** SDS-PAGE-Analyse (CBB-Färbung) der Reinigung von LAPD+2_C-His über eine Co^{2+} -NTA-Säule nach Expression im pASK43(+)-Kontext im 500-ml-Maßstab in BL21(DE3)-Zellen mit pKT270_SsHO1 (Induktion mit $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ AHT bzw. 1 mM IPTG). Die Analyse der Elutionsfraktionen zeigt eine deutliche Bande bei $\sim 100 \text{ kDa}$ (\triangleq LAPD). **B.** Zn-induzierte Fluoreszenz; mit gereinigtem *DrBPhy*-WT als Positivkontrolle. Die Ausbeute an LAPD_C-His betrug $\sim 1 \text{ mg/L}$ Expressionskultur. **C.** UV/vis-Absorptionsspektrum von gereinigter LAPD+2_C-His, dunkeladaptiert (durchgezogene Kurve), mit saturierendem Rotlicht adaptiert (Kaltlichtquelle mit 690-nm-Interferenzfilter; gestrichelte Kurve) und mit saturierendem Fernrotlicht adaptiert (Kaltlichtquelle mit 750-nm-Interferenzfilter; gepunktete Kurve). (SDS-PAGE-Proben: L = Lysat, P = Pellet, Ü = Überstand, D = Durchlauf, W = Waschfraktion, K = Kontrolle, +BV = mit Rekonstitution von Holo-LAPD+2 mit Biliverdin-Überschuss im Lysat).

3.2.1 UV/vis-Spektroskopie und Photochemie von LAPD

Stationäre UV/vis-Spektren von LAPD unter verschiedenen Lichtqualitäten

Stationäre UV/vis-Spektren von LAPD entsprachen qualitativ denjenigen einer Kontrollreinigung von *DrBPhy*-WT (nicht gezeigt, s. Tab.4) und waren mit publizierten Spektren von *DrBPhy*-WT vergleichbar [70]. Aufgenommene und publizierte *DrBPhy*-WT-Spektren wichen bezüglich der Absorptionsmaxima (λ_{\max} /nm) nur geringfügig von LAPD ab (Soret-Bande bei $\lambda_{\max} \sim 400$ nm und Q-Banden für P_r bei $\lambda_{\max} \sim 700$ nm, für P_{fr} bei $\lambda_{\max} \sim 751$ nm) (s. Tab.4). Das Verhältnis der Absorptionsmaxima von Q- (A_{700}) zu Soret-Bande (A_{400}) betrug für dunkeladaptierte LAPD und *DrBPhy*-WT [70] $\sim 1,9$ bzw. $\sim 2,7$. Das deutete auf einen Unterschied in der Konformation von Biliverdin in der Chromophor-Bindungstasche [70]. Das Verhältnis des Absorptionsmaximums bei 280 nm (A_{280}) zu Q-Bande (A_{700}) betrug für gereinigtes LAPD $\sim 2,1$; A_{280} setzt sich aus der Absorption der aromatischen Aminosäurereste des Proteins und des Biliverdin-Chromophors bei 280 nm zusammen. Mit diesem Referenzwert wurden Reinigungen ähnlicher *DrBPhy*-Spezies innerhalb dieser Arbeit verglichen. Der Anteil des Holoproteins (\triangleq BV) wurde nach Denaturierung von LAPD mit Guanidiniumhydrochlorid UV/vis-spektroskopisch bestimmt [157] (s. Abschnitte 2.7.3 & 3.3.2, Abbildung 34B). Mit $97 \pm 5\%$ LAPD-Holoprotein gelang eine nahezu vollständige Rekonstitution von Holo-LAPD mit Chromophor [157]. Die intrinsische Lyase-Aktivität der GAF-Domäne wurde somit im LAPD-Fusionskonstrukt nicht beeinträchtigt [55], was durch die Fluoreszenz-basierten Zn^{2+} -SDS-PAGE-Assays und spektralen A_{280}/A_{700} -Verhältnisse belegt wurde (z.B. Abbildung 27B&C).

Dunkeladaptierte LAPD wurde mit Licht unterschiedlicher Qualitäten bestrahlt, und UV/vis-Spektren wurden im photostationären Gleichgewicht aufgenommen (Abbildung 28A-C). Nach Bestrahlung mit R-Licht (690 nm) wurde ein maximales A_{751}/A_{700} -Verhältnis von $\sim 1,4$ erreicht. Durch Anregung der langwelligeren spektralen P_{fr} -Flanke mit FR-Licht (750-770 nm) wurde der P_r -Zustand quantitativ wiederhergestellt (Abbildung 28A). Die $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Photokonversion war umso effizienter, je höher der Anteil langwelligerer Komponenten im FR-Licht war. Nach Adaptation von LAPD mit Rotlicht wurde mit einer leistungsstarken IR-LED ($I_{\max}(\lambda) = 850$ nm; $W = 28$ mW cm $^{-2}$; Osram) der P_r -Zustand innerhalb von 5 min quantitativ wiederhergestellt (Abbildung 28B). Die vollständige $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Photokonversion war bedingt durch die geringe Rate der Rückreaktion, d.h. der $P_r \rightarrow P_{fr}$ -Konversion durch die kurzwelligen Anteile des IR-

LED-Lichts: Sowohl die Extinktion des P_r -Zustands im kurzwelligen Bereich der IR-LED-Intensität als auch die Intensität der Lichtquelle (FWHM, 30 nm) im langwelligen Bereich der P_r -Absorption waren gering ($\sim 3\%$ von A_{700} [70] bzw. $\sim 0,5\%$ von der relativen Intensität der Peakemission bei $\lambda = 850$ nm). Umgekehrt ist die verhältnismäßig langsame $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Photokonversion durch den geringen Absorptionsquerschnitt der P_{fr} -Form (A_{800} betrug $\sim 19\%$ von A_{751} [70]) an der kurzwelligen Flanke der IR-Intensität (I_{800} betrug $\sim 6\%$ von der relativen Intensität der Peakemission bei $\lambda = 850$ nm) zu erklären.

Anregung von LAPD mit Blaulicht (LED ~ 455 nm) führte zu einer unvollständigen Photokonversion des P_r -Zustandes mit dem A_{751}/A_{700} -Verhältnis von $\sim 0,7$ und dem isosbestischen Punkt $\lambda_{IB} = 721$ nm. Isosbestische Punkte für alle photochemischen $P_r \leftrightarrow P_{fr}$ -Prozesse deuteten auf Übergänge zwischen zwei Zuständen hin. Die Anregung eines kanonischen Bakteriophytochroms über die Soret-Bande mit Blaulicht (bei $\lambda_{max} \sim 400$ nm) wurde ebenfalls für *Agrobacterium tumefaciens* BPhy1 (Agp1) beschrieben [235], was dem elektronischen $S_0 \rightarrow S_2$ -Übergang entspricht. Im Gegensatz dazu stellt die Q-Bande den $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang dar.

Rückkehrkinetik von LAPD nach Bestrahlung mit Rotlicht (R)

Die Kinetik der thermischen Reversion wurde durch zeitabhängige Messung des P_{fr} -Zerfalls in den Grundzustand P_r bei A_{751} bzw. A_{700} aufgenommen. Die Analyse ergab Zeitkonstanten τ für den P_{fr} -Zerfall bzw. die P_r -Bildung (Abbildung 28F). Die Rückkehrkinetik wurde durch einen biexponentiellen Fit approximiert (für $\Delta t = 137$ min) (Tab.3). Für den Abbau von A_{751} und die Reversion von A_{700} wurde jeweils ein schneller und ein langsamer Prozess zu $\sim 20\%$ bzw. zu $\sim 80\%$ bestimmt (Abbildung 28F u. Tab.4). Ein isosbestischer Punkt wurde bei ~ 722 nm determiniert (Zeitbereich: 180 min, Abbildung 28D). Zeitkonstanten des langsamen und schnellen Prozesses der P_r -Reversion waren um 40% bzw. 30% geringer als die des P_{fr} -Zerfalls (Tab.4). $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Reversion über eine längere Dunkeladaptation (18h) zeigte keinen isosbestischen Punkt mehr, was auf zusätzliche photochemische Prozesse oder Proteindegradation hindeutete. Im beobachteten Zeitintervall ($\Delta t = 1080$ min) wurde der P_r -Grundzustand nicht vollständig wiederhergestellt; ebenso wurde eine vollständige Reversion von *DrBPhy*-WT in der Literatur nicht beschrieben [70]. Bei einer Langzeitmessung über 64 Tage bei 4 °C wurden nach Rotlichtbestrahlung während der Dunkeladaptation in bestimmten Zeitintervallen UV/vis-Spektren aufgenommen.

Auch hier war die thermische $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Reversion nicht vollständig reversibel (nicht gezeigt). Diese war durch einen schnelleren Abbau von P_{fr} charakterisiert [110].

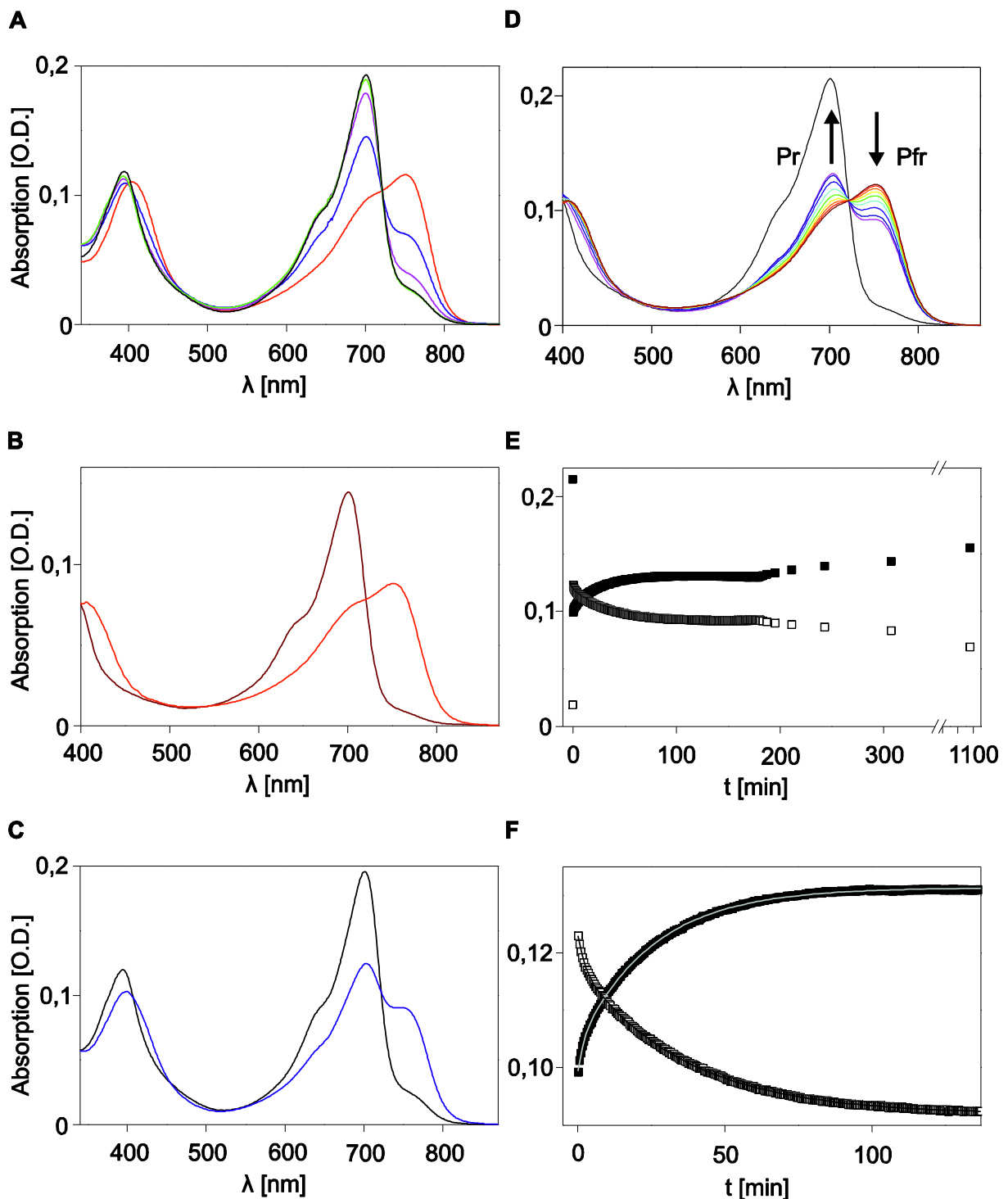


Abbildung 28. Stationäre UV/vis-Spektren und Photochemie von gereinigter LAPD_C-His. A. Wiederherstellung des P_r -Zustands durch Photokonversion mittels FR-Licht nach anfänglicher Rotlichtanregung von LAPD_C-His (UV/vis-Spektren). Sequenz der Lichtadaptation: dunkeladaptiert (schwarze Kurve), plus Anregung mit 1 min 690-nm-Licht (LED; rote Kurve), plus 32 min 750-nm-Licht (Kaltlichtquelle mit IF-Filter; blaue Kurve), plus 1 min 750-

nm-Licht (LED; violette Kurve), plus 1 min 770-nm-Licht (LED; grüne Kurve). **B.** UV/vis-Spektren von LAPD nach Anregung mit 2 min 690-nm-Licht (LED, rote Kurve) und 5 min 850-nm-Licht (LED; braune Kurve). **C.** UV/vis-Spektren von LAPD nach Anregung mit 30 s Blaulicht (~455-nm-LED; blaue Kurve) und im Dunkeln (schwarze Kurve). Alle Spektren in **A-C** sind photostationär bei Lichtsättigung oder Dunkeladaptation aufgenommen. **D.** UV/vis-Spektrenserie der Rückkehrkinetik von LAPD im Dunkeln nach 30 s Bestrahlung mit 670-nm-Licht (LED) (dunkelrote Kurve, $\Delta t = 1,4$ s, bis violette Kurve, $\Delta t = 128$ min) und dunkeladaptierte LAPD (schwarze Kurve). Schwarze Pfeile markieren den Aufbau von P_r und den Abbau von P_{fr} nach der Zeit. **E.** Zeitaufgelöste Darstellung ($\Delta t = 1080$ min) der Rückkehrkinetik aus **C** bei A_{700} (schwarze Quadrate) und A_{751} (weiße Quadrate). Das schwarze Quadrat oben links ist A_{700} des LAPD-Dunkelzustands, das weiße Quadrat unten links A_{751} unmittelbar vor Belichtung. **F.** Rückkehrkinetik aus **E** in kleinerem Zeitbereich ($\Delta t = 137$ min). Die Rückkehrkinetik bei A_{700} (schwarze Quadrate) und A_{751} (weiße Quadrate) wurde in diesem Zeitbereich mit der Funktion des biexponentiellen Zerfalls approximiert (graue durchgezogene Kurven). Die ermittelten Zeitkonstanten τ sind Tabelle 4 zu entnehmen. **A-F.** Die Beleuchtungsdauer mit jeweiliger Lichtqualität entsprach der Zeit bis zum Erreichen des photostationären Gleichgewichts bei bestimmter Lichtintensität und Wellenlänge.

Die Messung der Rückkehrkinetik von LAPD ist als erste Charakterisierung zu betrachten. Beispielsweise regte das verwendete Messlicht (Tungsten-Halogenlampe) einen Teil der P_r -Population bei jedem Messpunkt an und hatte einen Anteil an der photochemischen Reaktion. Eine logarithmische Verlängerung des Messintervalls, d.h. eine Verringerung der eingestrahlt Lichtmenge des Messlichts, beeinflusste die Rückkehrkinetik (Abbildung 28E): Nach 3 h konstantem Zeitintervall von $\Delta t = 30$ s wurde das Zeitintervall nach jedem Messpunkt verdoppelt, was zu einer Modulation der thermischen Reversion führte. Die unterschiedlichen apparenten Zeitkonstanten τ von P_{fr} -Abbau und P_r -Bildung (s.o.) können durch verschiedene Intensitäten der Tungsten-Halogenlampe bei I_{751} und I_{700} begründet sein. Eine weitere detaillierte Analyse mit entsprechenden UV/vis-spektroskopischen Einstellungen (z.B. Graufilter, schwaches monochromatisches Messlicht) könnte diesen Sachverhalt klären.

Tabelle 4. Spektrale und photochemische Eigenschaften von LAPD.

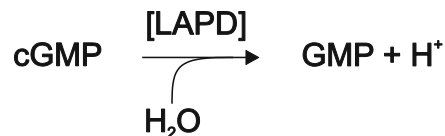
Protein	LAPD ¹	DrBPhy- WT ¹	DrBPhy- WT [70]	DrBPhy- PCD [110]	PaBPhy- PDE +2 ¹
P_r (λ_{\max})/ nm	701	702	700	~700	700
Rot-bestrahlt (λ_{\max})/ nm	752	752	751	750	746
Soret⁴ (λ_{\max})/ nm	393	397	394	~400	~400
Ratio					
Q-Bande (A₇₀₀):Soret (A_{max})	~1,9	N.A.	~2,7	N.A.	~0,5
Ratio					
A₂₈₀:Q-Bande (A₇₀₀)	~2,1	N.A.	~1,2	N.A.	~7,7
Thermische Reversion		N.A.	~30% P _r - Reversion nach 2 h	N.A.	N.A.
P_{fr} → P_r					
<u>P_r/A₇₀₀</u>					
τ_1 / min	25,1 ± 0,1				
Amplitude τ_1	82,0%				
τ_2 / min	1,7 ± 0,1				
Amplitude τ_2	18,0%				
<u>P_{fr}/A₇₅₁</u>					
τ_1 / min	35,3 ± 0,2				
Amplitude τ_1	80,3%				
τ_2 / min	2,2 ± 0,1				
Amplitude τ_2	19,7%				
Isosbestischer Punkt/ nm	722	722	721	N.A.	719
Prozess	Thermische Reversion	R/FR- Zyklus	R/FR- Zyklus		R/FR- Zyklus

¹Vorliegende Arbeit.

3.2.2 Enzymatische Aktivität von LAPD

cGMP-Hydrolyse durch LAPD

Für die enzymatische Charakterisierung von LAPD wurde die cGMP-Hydrolyse bei verschiedenen Substratkonzentrationen zeitabhängig mit dem HPLC-basierten PDE-Assay vermessen (s. Abschnitt 2.6.4). Die LAPD-katalysierte Hydrolyse von cGMP hat folgende Reaktionsgleichung:



Das HPLC-Elutionsprofil eines mit R-Licht (690 nm) adaptierten Reaktionsansatzes von 100 μM cGMP zeigt die Hydrolyse von cGMP zu GMP bei vier Zeitpunkten (Abbildung 29A). Lichtadaptierte LAPD offenbarte bei allen verwendeten Konzentrationen (25-1000 μM) eine höhere Anfangsgeschwindigkeit (v_0) des cGMP-Umsatzes als dunkeladaptierte (Abbildung 29B&C). Die Enzymkinetik ließ sich bei beiden Lichtbedingungen durch die hyperbolische Michaelis-Menten-Funktion beschreiben (Abbildung 29C): K_M -Werte von $440 \pm 140 \mu\text{M}$ im Dunkeln und $340 \pm 20 \mu\text{M}$ bei Rotlicht waren untereinander vergleichbar, wobei sie höher als der Literaturwert für *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) von $78 \pm 5 \mu\text{M}$ waren [200]. Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} der cGMP-Hydrolyse wurde unter Rotlichtbestrahlung von $v_{\text{maxDUNKEL}} = 2,5 \pm 0,4 \mu\text{M nM min}^{-1}$ auf $v_{\text{maxLICHT}} = 15,1 \pm 0,3 \mu\text{M nM min}^{-1}$ ~6-fach erhöht. Damit lag die Lichtaktivierung von LAPD in derselben Größenordnung wie die allosterische Aktivierung der *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) durch cGMP, die mit Faktor ~4 bestimmt wurde [200]. Rotlichtadaptierte LAPD hatte dabei eine ~6-fach höhere spezifische v_{max} als vollständig aktivierte *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) [200].

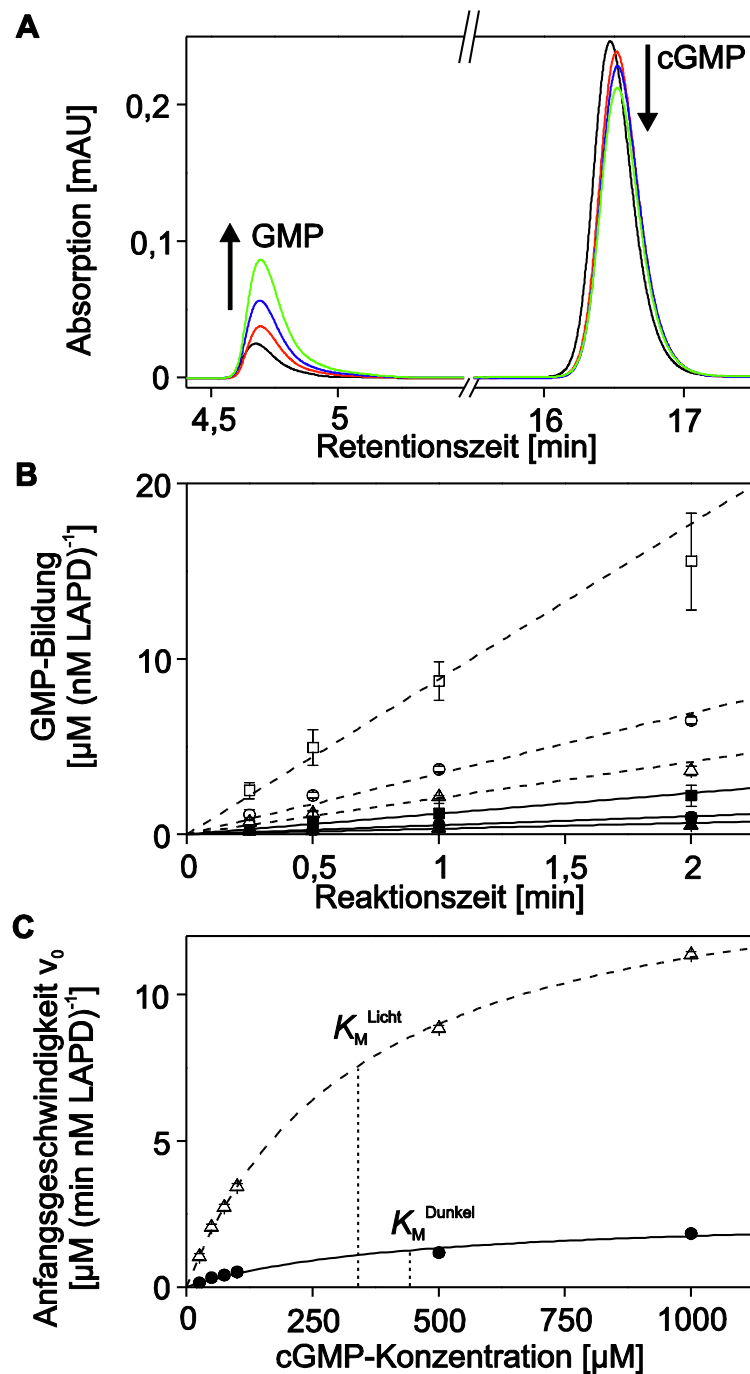


Abbildung 29. Rotlichtaktivierte cGMP-Hydrolyse durch LAPD. **A.** Aus einem Reaktionsansatz mit 5 nM rotlichtadaptierter LAPD und 100 μM cGMP wurden Aliquots nach 15 s (schwarze Kurve), 30 s (rote Kurve), 60 s (blaue Kurve) und 120 s (grüne Kurve) entnommen und mittels isokratischer Umkehrphasen-HPLC mit Ionenpaarreagenz (4 mM Tetraammoniumbutyliodid) analysiert. Der cGMP-Peak nimmt mit der Zeit ab (Substrat; Pfeil nach unten), wobei gleichzeitig der GMP-Peak zunimmt (Produkt; Pfeil nach oben). **B.** Die Integration der Peak-Flächen aus der HPLC-Analyse ergab die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der Hydrolysereaktion bei Konzentrationen von 50 μM (Δ), 100 μM (\circ) und 500 μM (\square) cGMP. Im Vergleich zu dunkeladaptierten Reaktionsansätzen (geschlossene Symbole) wird die PDE-Aktivität von LAPD unter Rotlichtbestrahlung (690 nm) erhöht (offene Symbole). Die Substratumsätze sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei Messungen. Lineare Regression ergab die Werte von v_0 und ist als durchgezogene (dunkel) und gestrichelte (690-nm-Licht) Gerade dargestellt. **C.** LAPD offenbart sowohl im Dunkeln (\bullet , durchgezogene Kurve) als auch unter 690-nm-Licht

(weiße Kaltlichtquelle mit IF-Filter, HWB 10 nm, Leistung $3,3 \text{ mW cm}^{-2}$; Δ , gestrichelte Kurve) eine Michaelis-Menten-Kinetik der cGMP-Hydrolyse. Die Werte von v_{\max} und K_M wurden über die Methode der kleinsten Quadrate bestimmt und sind als Mittelwert \pm asymptotischer Standardfehler angegeben. v_{\max} wird von $2,5 \pm 0,4 \mu\text{M min}^{-1} (\text{nM LAPD})^{-1}$ im Dunkeln auf $15,1 \pm 0,3 \mu\text{M min}^{-1} (\text{nM LAPD})^{-1}$ unter 690-nm-Licht erhöht. K_M -Werte betragen $440 \pm 140 \mu\text{M}$ im Dunkeln und $340 \pm 20 \mu\text{M}$ unter 690-nm-Licht. Die hyperbolische Approximation (durchgezogene und gestrichelte Kurven, s.o.) ist dargestellt.

cAMP-Hydrolyse durch LAPD

Aufgrund der dualen PDE-Aktivität der PDE2A-Domäne zeigte LAPD ebenfalls eine Hydrolyseaktivität gegenüber cAMP (Abbildung 30A). Die LAPD-Aktivität bezüglich der cAMP-Hydrolyse wurde mit dem HPLC-basierten PDE-Assay gemessen (s. Abschnitt 2.6.4). Die Lichtaktivierung war dabei vergleichbar mit der Regulation der cGMP-Hydrolyse (Abbildung 30B&C). Gegenüber Reaktionsansätzen mit cGMP wurde mit cAMP eine höhere Substrataffinität bei Lichtbedingungen gemessen als unter Rotlicht, mit $K_{\text{MDUNKEL}} = 470 \pm 170 \mu\text{M}$ und $K_{\text{MLICHT}} = 180 \pm 20 \mu\text{M}$. Die Maximalgeschwindigkeit v_{\max} ist im Lichtzustand mit $6,5 \pm 0,2 \mu\text{M nM}^{-1} \text{min}^{-1}$ geringer als bei der cGMP-Hydrolyse. Der basale Dunkelwert von $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M nM}^{-1} \text{min}^{-1}$ ist mit den Daten zur cGMP-Hydrolyse vergleichbar. Im Vergleich dazu ist die Aktivität der cAMP-Hydrolyse von PDE2A-Isolaten aus bovinem Herzmuskelgewebe mit v_{\max} von $\sim 12,4 \mu\text{M nM}^{-1} \text{min}^{-1}$ und $K_M \approx 30 \mu\text{M}$ [236] beschrieben.

cGMP-Hydrolyse unter verschiedenen Lichtqualitäten

Die LAPD-Aktivität wurde unter verschiedenen saturierenden Beleuchtungsbedingungen bei einer Substratkonzentration von 1 mM cGMP und 2 min Reaktionszeit getestet (Abbildung 31; Endpunktbestimmung). Mit dem HPLC-basierten PDE-Assay wurde der Regulationsfaktor von ~ 7 bezüglich des cGMP-Umsatzes im Dunkeln und unter R-Licht (690 nm) reproduziert (s. Abbildung 29C). Um festzustellen, wie hoch die LAPD-Aktivität nach einem R/FR-Zyklus ist, wurden Reaktionsansätze nach Adaptation mit R-Licht (690 nm) mit FR-Licht (850 nm) bestrahlt. Die enzymatische Aktivität nahm mit zunehmender Dauer der FR-Bestrahlung ab, was mit der photochemischen Bildung der basalaktiven P_r -Form aus P_{fr} korrelierte (s. Abbildung 28B). In diesen Experimenten wurde jedoch nur eine $\sim 2,6$ -fache Reduktion von maximal aktivierter LAPD durch einen R/FR-Zyklus erzielt und nicht, wie erwartet, eine vollständige Wiederherstellung der Dunkelaktivität. Die photochemische Umwandlung hatte zuvor unter vergleichbarer R/FR-Sequenz eine vollständige Wiederherstel-

lung von P_r aus dem P_{fr}/P_r -Mischzustand innerhalb von ~ 5 min erwirkt (s. Abschnitt 3.2.1).

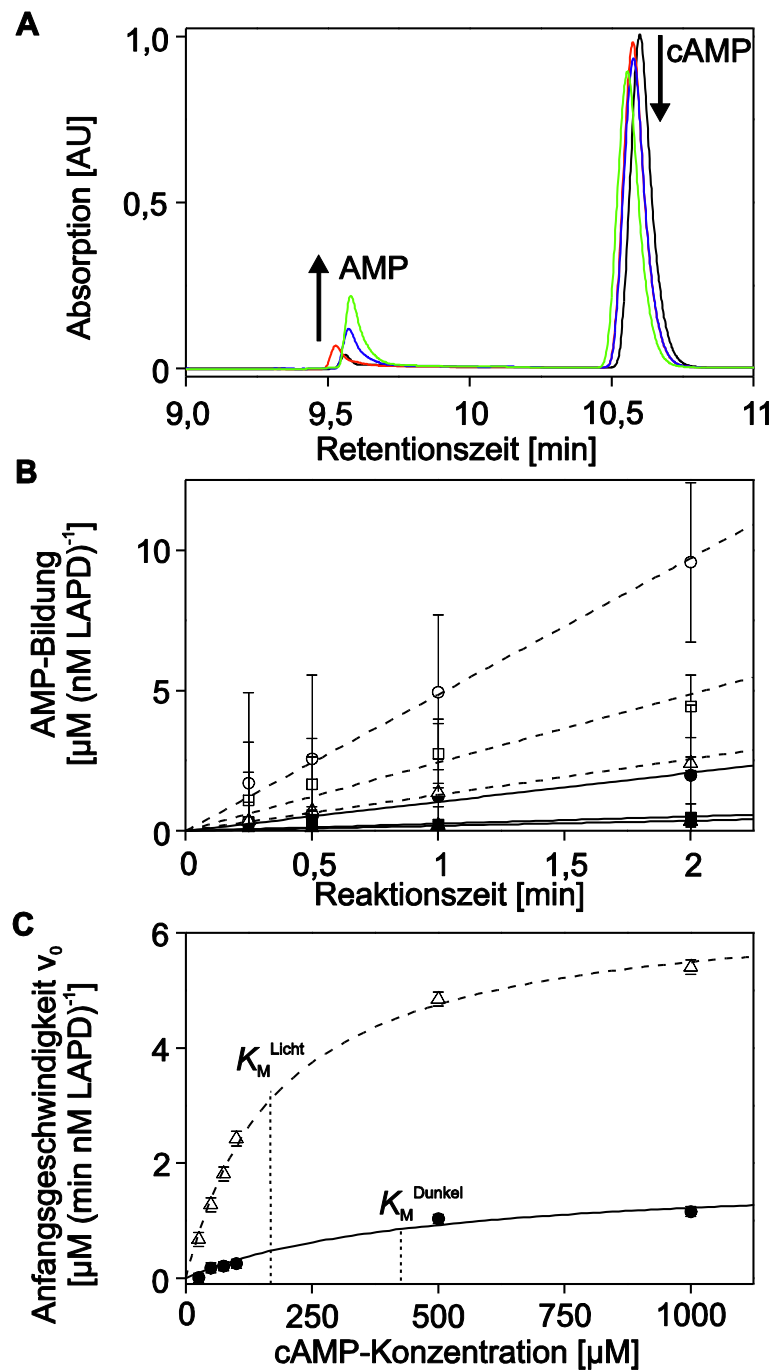


Abbildung 30. Rotlichtaktivierte cAMP-Hydrolyse durch LAPD. **A.** Aus einem Reaktionsansatz mit 5 nM rotlichtadaptierter LAPD und 100 μM cAMP wurden Aliquots nach 15 s (schwarze Kurve), 30 s (rote Kurve), 60 s (blaue Kurve) und 120 s (grüne Kurve) entnommen und mittels Umkehrphasen-HPLC mit Lösungsmittel-Gradient analysiert. Der cAMP-Peak nimmt mit der Zeit ab (Substrat; Pfeil nach unten), wobei gleichzeitig der AMP-Peak zunimmt (Produkt; Pfeil nach oben). **B.** Die Integration der Peak-Flächen aus der HPLC-Analyse ergab die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der Hydrolysereaktion bei Konzentrationen von 50 μM (Δ), 100 μM (\square) und 500 μM (\circ) cAMP. Im Vergleich zu dunkeladaptierten Reaktionsansätzen (geschlossene Symbole) wird die PDE-Aktivität von LAPD unter

Rotlichtbestrahlung (690 nm) erhöht (offene Symbole). Die Substratumsätze sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei Messungen. Lineare Regression ergab die Werte von v_0 und ist als durchgezogene (dunkel) und gestrichelte (690-nm-Licht) Gerade dargestellt. **C.** LAPD offenbart sowohl im Dunkeln (\bullet , durchgezogene Kurve) als auch unter 690-nm-Licht (weiße Kaltlichtquelle mit IF-Filter, HWB 10 nm, Leistung $3,3 \text{ mW cm}^{-2}$; Δ , gestrichelte Kurve) eine Michaelis-Menten-Kinetik der cAMP-Hydrolyse. Die Werte von v_{\max} und K_M wurden über die Methode der kleinsten Quadrate bestimmt und sind als Mittelwert \pm asymptotischer Standardfehler angegeben. v_{\max} wird von $1,8 \pm 0,3 \mu\text{M min}^{-1} (\text{nM LAPD})^{-1}$ im Dunkeln auf $6,5 \pm 0,2 \mu\text{M min}^{-1} (\text{nM LAPD})^{-1}$ unter 690-nm-Licht erhöht. K_M -Werte betragen $470 \pm 170 \mu\text{M}$ im Dunkeln und $180 \pm 20 \mu\text{M}$ unter 690-nm-Licht. Die hyperbolische Approximation (durchgezogene und gestrichelte Kurven, s.o.) ist dargestellt.

Die enzymatische Aktivität von R-lichtadaptierter (690 nm) LAPD wurde ebenfalls durch anschließende Dunkeladaptation reduziert, was mit der thermischen $P_{\text{fr}} \rightarrow P_{\text{r}}$ -Reversion korrelierte (s. Abbildung 28D-F). Im Gegensatz zur schnelleren $P_{\text{fr}} \rightarrow P_{\text{r}}$ -Photokonversion zerfielen hier nur $\sim 20\%$ der maximalen LAPD-Aktivität nach ~ 4 min. Entsprechende Kontrollexperimente zeigten einerseits die Steigerung der LAPD-Dunkelaktivität um $\sim 20\%$ nach einfacher Bestrahlung mit FR-Licht (IR-LED 850 nm). Die Aktivitätszunahme basierte vermutlich auf der Absorption im kurzwelligen Bereich des LED-Emissionsspektrums und ineffizienter $P_{\text{fr}} \rightarrow P_{\text{r}}$ -Reaktion (s. Abschnitt 3.2.1). Andererseits wurde FR-lichtadaptierte LAPD (IR-LED 850 nm) durch R-Licht (690 nm) vollständig aktiviert.

LAPD wurde durch Blaulicht (LED 455 nm) vollständig aktiviert. Die PDE-Aktivität unter Blaulicht korrelierte mit der Anregung von dunkeladaptierter LAPD über die Soret-Bande bei $\lambda \sim 400 \text{ nm}$; unter Blaulicht war die aktive P_{fr} -Form gebildet worden (s. Abschnitt 3.2.1). Interessanterweise wurde maximale PDE-Aktivität bei unvollständiger $P_{\text{r}} \rightarrow P_{\text{fr}}$ -Photokonversion unter Blaulicht bestimmt, d.h., eine vergleichbare Enzymaktivität wurde bei vollständiger P_{fr} -Bildung unter Rotlicht gemessen. Dieser Befund deutet auf einen noch unverstandenen Photozyklus hin und erweitert die Diskrepanz zwischen Photochemie und PDE-Aktivität (s.o.).

Auch Weißlicht führte zu maximaler PDE-Aktivität, was durch alle aktivierenden spektralen Komponenten der Kaltlichtquelle zu erklären war.

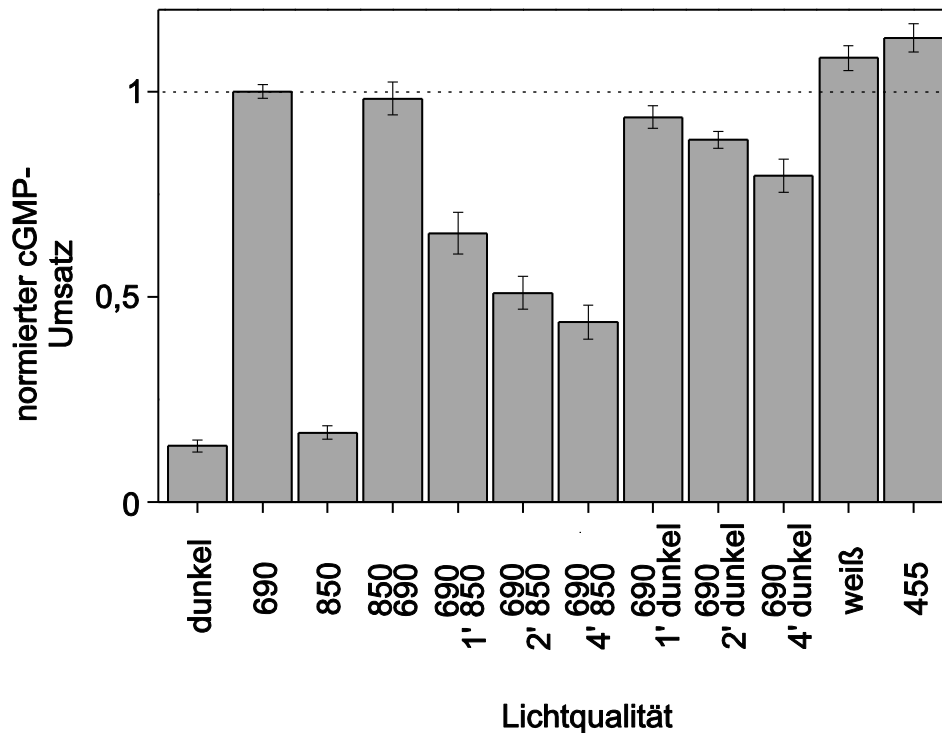


Abbildung 31. cGMP-Umsatz von LAPD bei verschiedenen Lichtqualitäten. Der Einfluss unterschiedlicher saturierender Lichtqualitäten auf die Aktivität von LAPD wurde bei einer Anfangskonzentration von 1 mM cGMP untersucht (Endpunktbestimmung). LAPD wurde vor Reaktionsstart mit cGMP verschiedenen Belichtungsprotokollen unterzogen: 6 min Dunkelheit; 2 min 690-nm-Licht (HWB 10 nm, Leistung 3,3 mW cm⁻²); 850-nm-Licht (HWB 30 nm, Leistung 28 mW cm⁻²); 4 min 850-nm-Licht gefolgt von 2 min 690-nm-Licht; 2 min 690-nm-Licht gefolgt von 1, 2 und 4 min 850-nm-Licht; 2 min 690-nm-Licht gefolgt von 1, 2 und 4 min Dunkelheit; 5 min 455-nm-Licht (HWB 20 nm, Leistung 75 mW cm⁻²); 2 min kaltes Weißlicht (150 W, DCR III, Schott); die Gesamt-Adaptationsperiode von 6 min wurde ggf. jeweils mit Dunkelperioden vervollständigt, und die jeweils letzte Bedingung der Beleuchtungssequenz wurde während der Hydrolyse beibehalten. Der cGMP-Umsatz wurde auf den Wert bei 690-nm-Licht normalisiert. Die Umsätze sind Mittelwerte ± Standardfehler aus vier Messungen (Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit C. Schumacher).

3.3 Mechanistische Analyse: Funktion von Linker und Chromophor bei der Signaltransduktion von LAPD

3.3.1 LAPD-Linkervarianten

Die Enzymaktivität und Regulation der synthetischen lichtreprimierten Histidinkinase YF1 hingen von der Länge des Coiled-Coil-Linkers ab [137]. Das Aktivitätsmuster von YF1-Linkervarianten zeigte eine entsprechende Heptadenperiodizität (s. Abschnitt 1.4). Bestimmte Varianten reproduzierten die lichtreprimierte Kinaseaktivität von YF1, andere waren lichtaktivierte Kinasen. Eine analoge Mutagenesestrategie hatte ausgehend vom konstitutiv inaktiven Fusionskonstrukt LAPD+2 aus der *In-silico*-Planung über Deletion von zwei Aminosäureresten die lichtregulierte LAPD ergeben (s. Abschnitt 3.2).

In dieser Arbeit wurden über Insertion und Deletion von einzelnen Aminosäureresten Linkervarianten generiert, von LAPD-4 über LAPD(0) zu LAPD+7 (s. Tab.4 u. Abbildung 32B&C). Alle LAPD-Varianten zeigten die spektrale *DrBPhy*-Signatur und eine konservierte R/FR-Photochemie, und der Einbau des Biliverdin-Chromophors lag bei allen Spezies in derselben Größenordnung (nicht gezeigt). Die Linkervarianten wurden im *In-vitro*-PDE-Assay bei der Substratkonzentration von 1 mM cGMP getestet, die im Bereich der Substratsättigung von LAPD liegt. Insertionen und Deletionen am mutmaßlichen Coiled-Coil-Linker führten zu enzymatischen Aktivitäten, die sich von LAPD unterschieden (Abbildung 32A). Während Insertionsmutante LAPD+1 im Vergleich zu lichtaktivierter LAPD durch eine intermediäre konstitutive Enzymaktivität charakterisiert war, zeigten alle anderen Varianten eine basale oder nicht messbare (**) PDE-Aktivität. Zwar waren Enzymaktivität und Lichtregulation abhängig von der Linkerlänge und die Linkersequenz somit ausschlaggebend für die intramolekulare Signaltransduktion vom Photosensor zum Effektor. Doch das Aktivitätsmuster der Linkervarianten zeigte keine klar ausgeprägte Heptadenperiodizität, wie sie bei Linkervarianten der lichtreprimierten Histidinkinase YF1 auftrat und mit der Beschaffenheit des Coiled-Coil-Linkers erklärt wurde [137]. Das Ausbleiben der Heptadenperiodizität der Enzymaktivität bei Linkervarianten -3/-4, +3/+4 und +7 ist vermutlich deren geringem Dynamikumfang der Lichtregulation und dem geringen Gesamtumsatz im HPLC-basierten PDE-Assay zuzuschreiben.

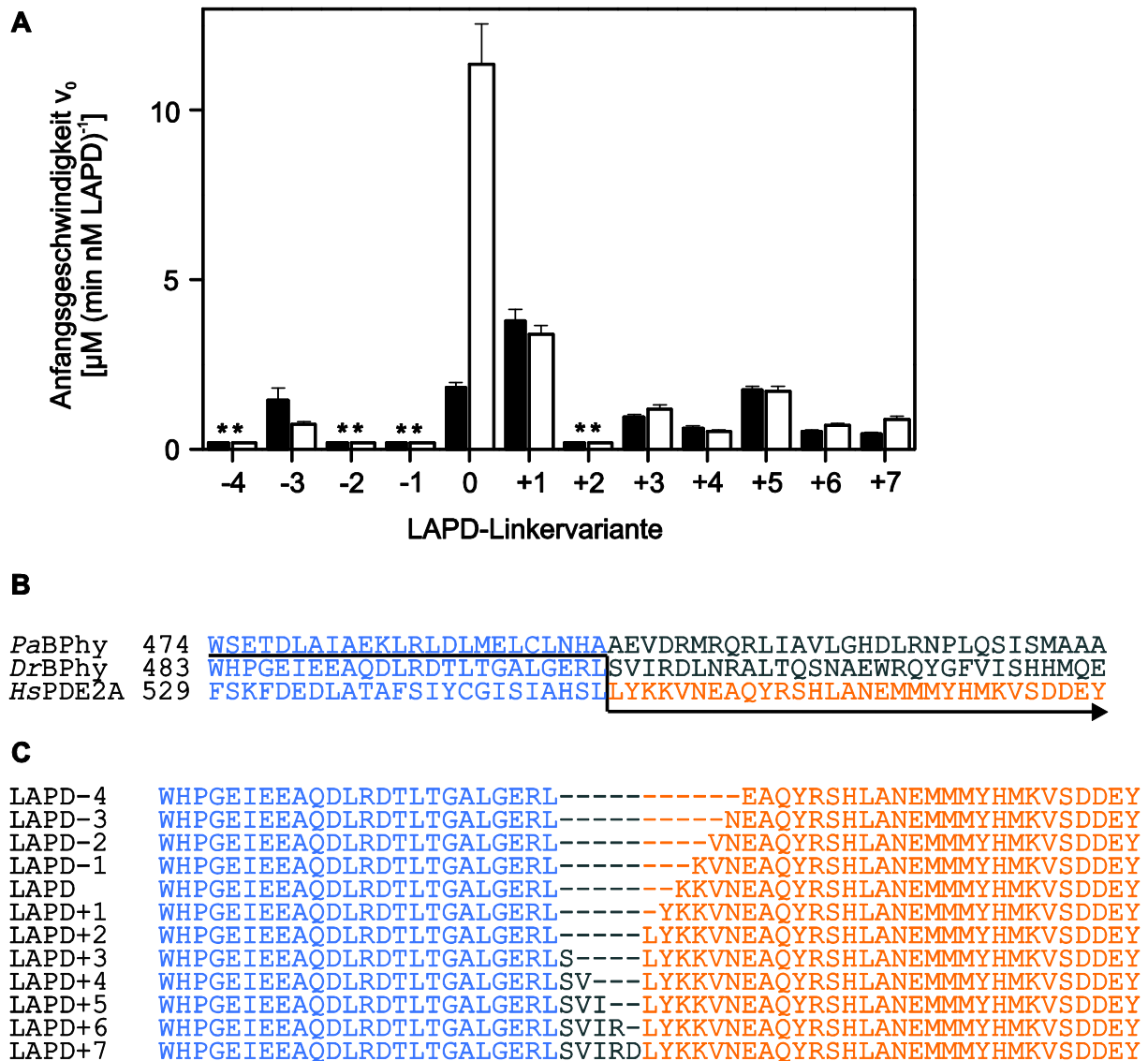


Abbildung 32. PDE-Aktivität von LAPD-Linkervarianten unter rotlicht- und dunkeladaptierten Bedingungen. **A.** Die katalytische Aktivität und Lichtregulation von LAPD-Mutanten war von der Länge der Linkersequenz zwischen Photosensor- und Effektor modul abhängig. Die Anfangsgeschwindigkeit v_0 der Hydrolyse-reaktion wurde bei 1 mM cGMP im Dunkeln (schwarze Säulen) oder unter 690-nm-Licht (HWB 10 nm, Leistung 3,3 mW cm⁻²; weiße Säulen) ermittelt. Werte von v_0 wurden durch lineare Regression ermittelt und sind als Mittelwert \pm asymptotischer Standardfehler angegeben. Sterne (**) markieren Aktivitäten unterhalb der Detektionsgrenze. **B.** Das Raster der Aminosäurerest-Sequenz im strukturbasierten Linkeralignment von PaBPhy, DrBPhy und HsPDE2A diente als Grundlage für die Erzeugung von LAPD-Varianten. Die Sequenz des initialen Konstrukts LAPD+2 ist mit einem schwarzen Pfeil unterstrichen. **C.** LAPD-Varianten wurden durch Insertion (LAPD+3 - LAPD+7) oder Deletion (LAPD+1 - LAPD-4) einzelner Aminosäurereste innerhalb der Linkerregion von LAPD+2 generiert.

Tabelle 5. Fusionskonstrukte zwischen DrBPhy und HsPDE2A.

Konstrukt	DrBPhy	HsPDE2A
LAPD-4	1-506	559-941
LAPD-3	1-506	558-941
LAPD-2	1-506	557-941
LAPD-1	1-506	556-941
LAPD	1-506	555-941
LAPD+1	1-506	554-941
LAPD+2	1-506	553-941
LAPD+3	1-507	553-941
LAPD+4	1-508	553-941
LAPD+5	1-509	553-941
LAPD+6	1-510	553-941
LAPD+7	1-511	553-941

3.3.2 Aktivität von Apo-LAPD

Um die Enzymaktivität von Apo-LAPD ohne Biliverdin zu messen, wurde die Mutante LAPD-C24A generiert, der der Cys-Rest zur Ausbildung der kovalenten Thioether-Bindung mit BV fehlt (vgl. Abschnitt 1.2.5). Die Bestimmung der Enzymaktivität von Apo-LAPD ist zum einen von mechanistischem Interesse: So wichen die Histidinkinase-Aktivitäten von Apo-Bakteriophytochromen von denen von entsprechenden Holo-Bakteriophytochromen in der P_r - und P_{fr} -akkumulierten Form ab. Zum anderen ermöglicht die Messung der Apoproteinaktivität eine Beurteilung von LAPD als potenziellem optogenetischem Werkzeug. Zwar betrug der Anteil an LAPD-Apoprotein ohne eingebautes Biliverdin weniger als $3 \pm 5\%$ in der gereinigten LAPD-Proteinprobe und entsprach daher einer quantitativen Rekonstitution (s. Abschnitt 3.2.1). Im Kontext einer *In-vivo*-Anwendung in eukaryotischen Modellsystemen ist eine vollständige Rekonstitution mit BV aber nicht *per se* sichergestellt.

Abweichend vom Standard-Expressions- und Reinigungsprotokoll (s. Abschnitt 3.2) wurden bei der Herstellung von LAPD-C24A die Koexpression von SsHO1 sowie die *In-vitro*-Rekonstitution im Lysat nicht durchgeführt. Das UV/vis-Spektrum von gereinigter LAPD-C24A zeigte nur die Absorption des Apoproteins bei 280 nm. Das Fehlen von Soret-, P_r - und P_{fr} -Absorptionsbanden bestätigte LAPD-C24A als Apoprotein ohne BV (Abbildung 33A). Im HPLC-basierten PDE-Assay bei

Substratkonzentration von 1 mM cGMP hatte LAPD-C24A eine spezifische Aktivität, die $43,7 \pm 5,6\%$ der Basalaktivität von dunkeladaptierter Holo-LAPD entsprach (Abbildung 33C).

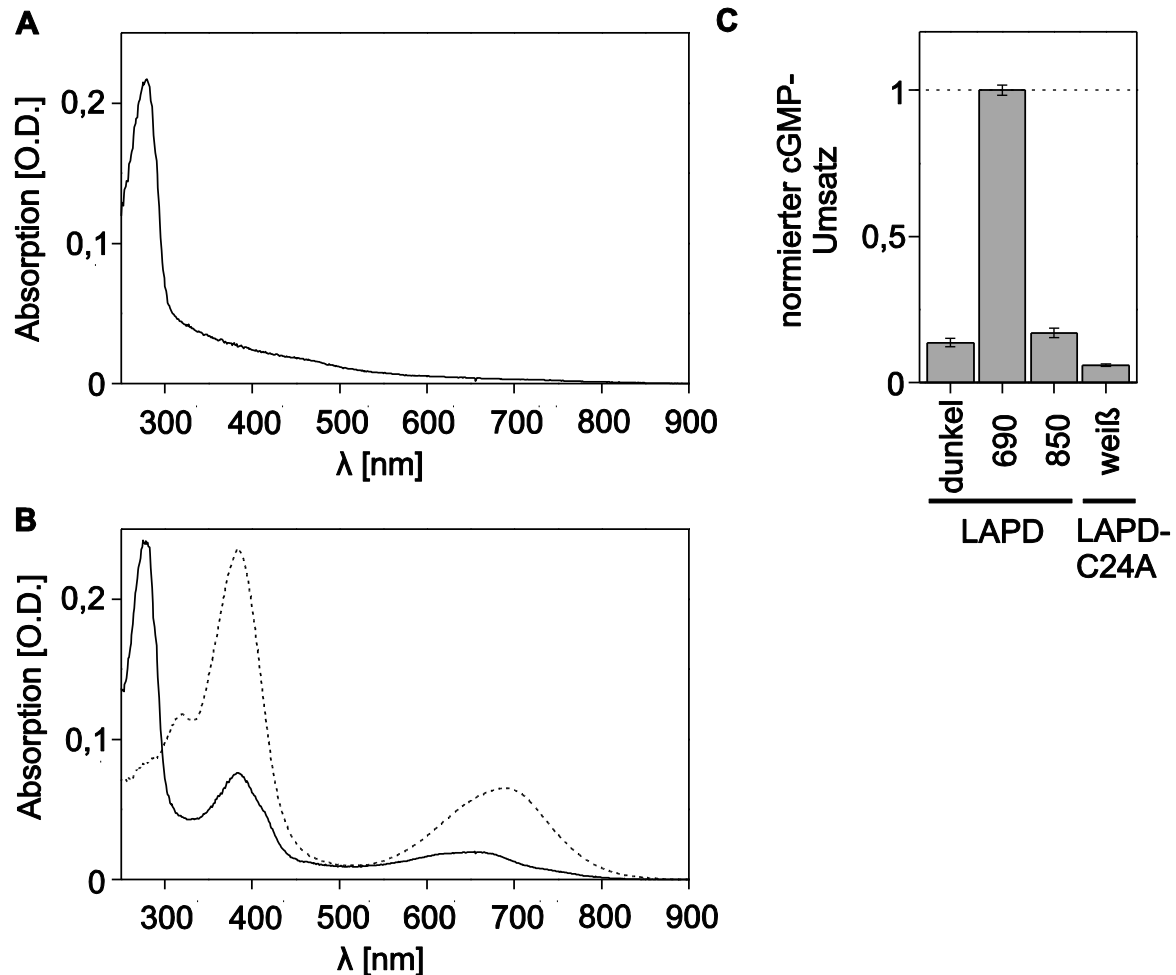


Abbildung 33. UV/vis-Spektrum von LAPD-C24A, Bestimmung des Apoprotein-Anteils in gereinigter LAPD-Probe und PDE-Aktivität von LAPD-C24A. **A.** Das mit der Basislinie korrigierte UV/vis-Spektrum der Mutante LAPD-C24A zeigt die für Proteine ohne Kofaktor typische Absorption aromatischer Aminosäurereste bei 280 nm (A_{280}). Da die Soret- und Q-Absorptionsbanden des BV-Chromophors fehlen, liegt LAPD-C24A quantitativ als Apoprotein vor. **B.** Der Grad der BV-Inkorporation in LAPD wurde durch UV/vis-Spektroskopie von LAPD bestimmt, die durch 6.5 M Guanidiniumhydrochlorid denaturiert wurde (durchgezogene Linie) [157]. Der Anteil von Holo-LAPD betrug $97 \pm 5\%$. Die Menge an Chromophor wurde über den Extinktionskoeffizienten von freiem BV bei 388 nm von 39900 M^{-1} berechnet; dabei wurde die Absorption von BV durch Zugabe des Denaturierungsreagenz wenig beeinflusst. Die Menge von Protein wurde über die A_{280} bestimmt, nachdem der theoretische Extinktionskoeffizient ermittelt und der Anteil der BV-Absorption (gestrichelte Kurve) bei dieser Wellenlänge subtrahiert wurde. **C.** LAPD-C24A zeigte eine basale PDE-Aktivität (rechts). Der cGMP-Umsatz der Hydrolysereaktion wurde bei 1 mM cGMP ermittelt. Dargestellt sind Kontrollmessungen mit LAPD unter Dunkelheit, 690-nm- und 850-nm-Licht (links). Der cGMP-Umsatz wurde auf den Wert bei 690-nm-Licht normalisiert. Die Umsätze sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier Messungen (Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit C. Schumacher).

3.4 In-vivo-Aktivität von LAPD

Nach der photo- und biochemischen Charakterisierung von LAPD *in vitro* wurden die Expression und die Aktivität in eukaryotischen Zellen getestet. Es war festzustellen, ob LAPD intrazelluläre Spiegel zyklischer Nukleotide (cGMP und cAMP) im zellphysiologischen Kontext lichtabhängig reguliert und damit ein potenzielles optogenetisches Werkzeug ist.

3.4.1 Elektrophysiologische Messungen an Oozyten

Zunächst wurden LAPD-Aktivitätsmessungen an einer eukaryotischen Einzelzelle durchgeführt, und als Testsystem diente die Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus laevis* Oozyten (Abbildung 34). Aktivitätsmessungen an Oozyten wurden bereits für die lichtaktivierten Adenylylzyklen euPAC und bPAC durchgeführt [126,127]. Dabei wurden die Zyklen mit dem CFTR-Kanal (*cystic fibrose transmembran conductance regulator*) oder einem CNG-Kanal (*cyclic nucleotide-gated channel*) koexprimiert, deren Leitfähigkeit für Kationen indirekt durch cAMP-abhängige PKA (*Proteinkinase A*) bzw. direkt durch intrazelluläre cAMP-Bindung erhöht wurde. Die lichtinduzierte cAMP-Synthese wurde demnach von den resultierenden Membranströmen abgeleitet. Ein elektrophysiologischer Assay mit CNG2A-exprimierenden Oozyten zur Detektion der zeitlich veränderlichen cAMP-Konzentration war in der AG Experimentelle Biophysik bereits etabliert worden (M.Stierl und M.Reh, HU Berlin). Ein analoger Ansatz wurde für die *In-vivo*-Messung der LAPD-Aktivität verwendet:

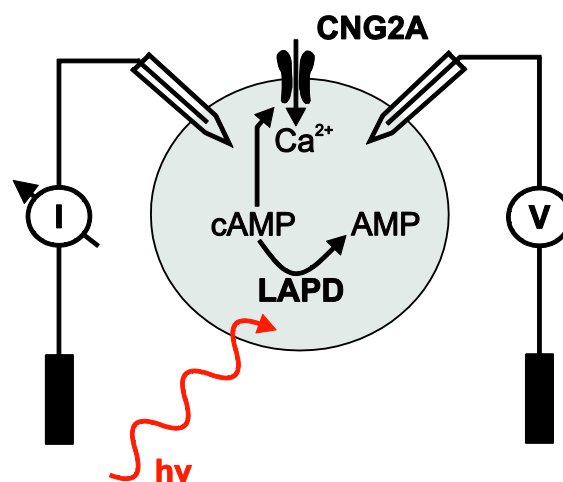


Abbildung 34. Aufbau des elektrophysiologischen LAPD-Funktionstests in *Xenopus laevis* Oozyten. Oozyten exprimieren nach Injektion der entsprechenden mRNAs transient LAPD und den cAMP-sensitiven Kationenkanal CNG2A (*cyclic nucleotide-gated*), der durch intrazelluläre cAMP-Bindung allosterisch geöffnet wird. Bei steigender cAMP-Konzentration wird der Einstrom von Kationen

aus dem Außenmedium (Messpuffer ORI) erhöht. Über eine Zwei-Spannungsklemme (2 Elektroden: I und V) wird konstitutiv ein negatives Membranpotential (-40 mV) an der Oozyte gehalten, so dass ein Einwärtsstrom positiv geladener Ionen im Stromstärke-Zeit (I-t)-Diagramm als negative Steigung (I/t) dargestellt wird. Rotlichtadaptierte LAPD degradiert endogene cAMP-Spiegel, woraufhin CNG2A-Kanäle geschlossen werden. Aufgrund der Abnahme der Membranleitfähigkeit für Kationen würde die Steigung der Stromstärke positiver werden bzw. dem Betrag nach reduziert werden.

LAPD und CNG2A-C460W/E583M aus *Rattus norvegicus* wurden in Oozyten koexprimiert. Diese cAMP-sensitive Mutante ($K_{0.5} = 0,83 \mu\text{M} \triangleq$ cAMP-Konzentration bei halbmaximaler Leitfähigkeitsänderung) erhöhte nach cAMP-Bindung die Kationen-Leitfähigkeit der Zellmembran [237]. Umgekehrt hatte ein Absenken des cAMP-Spiegels die Verringerung des Einwärts-Stroms von Kationen zur Folge. Koexprimierte LAPD würde durch cAMP-Degradation bei R-Licht somit den Membranstrom lichtabhängig reduzieren. Jedoch ist die Aktivität R-lichtadaptierter LAPD bei basaler intrazellulärer cAMP-Konzentration (2,0-2,5 μM) in *Xenopus laevis* Oozyten [238], ausgehend von der *In-vitro*-Bestimmung des K_M -Werts ($180 \pm 20 \mu\text{M}$), theoretisch ~80-fach geringer als die LAPD-Maximalgeschwindigkeit v_{max} . Die elektrophysiologische Messung wurde daher mit einem Stimulator von Klasse-I-bis-VIII- und X-Adenylylzyklasen durchgeführt, der zum künstlich induzierten Anstieg der cAMP-Konzentration in Oozyten führte; der physiologische Konzentrationsbereich von cAMP beträgt 0,1-50 μM [237]. Verwendet wurde das wasserlösliche und membrangängige Forskolin-Derivat NKH477. Im Vergleich zu Forskolin wurden von NKH477 eine 1,87-fach höhere Stimulation der Typ-V-Adenylylzyklase-Aktivität und eine vergleichbare Aktivierung von Typ-II- und Typ-III-Adenylylzyklasen berichtet (1,04- bzw. 0,89-fach) [239].

In Vorbereitung auf den elektrophysiologischen Oozyten-Assay wurde eine LAPD-Sequenz, die für die humane Kodonbenutzung adaptiert worden war (s. Abschnitt 3.4.2), über PCR amplifiziert und in den pGEM-HE-Vektor zwischen die Restriktionsstellen *Xma*II/*Bs*I/II (Vektor) bzw. *Age*II/*Bs*I/II (Insert) ohne Tag insertiert (*Xma*I und *Age*I generieren denselben 5'-Überhang CCGG; s. Abschnitt 5.4). Das pGEM-HE-Plasmid mit CNG2A-C460W/E583M-Sequenz wurde von M. Stierl (HU Berlin) zur Verfügung gestellt. Mittels *In-vitro*-Transkription (s. Abschnitt 2.5.9) wurden LAPD- und CNG2A-mRNA synthetisiert und per Ethanol-Fällung gereinigt. Zum Zweck der Proteinexpression wurden die Oozyten ($\varnothing \sim 1 \text{ mm}$) mit Glaskapillaren über einen Mikromanipulator perforiert, und diesen wurde LAPD- und

CNG2A-mRNA injiziert. Um eine möglichst große lichtabhängige Änderung der Stromamplitude zu erzielen, wurden unterschiedliche molare LAPD:CNG2A-Verhältnisse getestet. Nach Injektion wurden die Oozyten zur Holo-LAPD-Rekonstitution 3-5 Tage ohne oder mit 25 μ M Biliverdin im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation der Proteinexpression wurden die Oozyten in die Messkammer der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme transferiert und mit Glaselektroden in Messpuffer ORI angestochen (s. Abbildung 34). Zur Messung der cAMP-induzierten Ströme wurde an die Oozyte eine negative Haltespannung von -40 mV angelegt (s. Abschnitt 2.4.3). Daher verringerten einwärts strömende Kationen den Strom im Stromstärke (I)-Zeit (t)-Diagramm („negativer Strom“).

LAPD-Aktivität nach chemischer und optogenetischer Stimulation der cAMP-Synthese

Nach Zugabe des Forskolin-Derivats NKH477 zum Messpuffer ORI (10-50 μ M) wurde keine Veränderung des Einwärtsstroms gemessen (nicht gezeigt). Selbst der nicht-selektive PDE-Inhibitor (Familien 1-7, 10 und 11) IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) (0,5-1 mM) hatte keine Erhöhung der Membranleitfähigkeit, d.h. CNG2A-Kanalleitfähigkeit, zur Folge (nicht gezeigt). In diesem Oozyten-Ansatz wurde demnach der intrazelluläre Netto-cAMP-Spiegel durch Stimulation der endogenen AZs mit Forskolinderivaten nicht erhöht. Auch die Inhibition der endogenen PDEs und basalen LAPD-Aktivität mit IBMX hatte keine Erhöhung der Membranströme zur Folge.

Alternativ wurde versucht, die cAMP-Synthese durch Koexpression der photoaktivierten Adenylzyklase bPAC lichtinduziert zu steigern (s. Abschnitt 1.3). Vorteile waren eine durch Blaulichtbestrahlung zeitlich kontrollierbare AZ-Aktivität, eine reversible cAMP-Synthese und eine vernachlässigbare basale Aktivität im Dunkeln [127]. Unter anderem wurde durch den Einsatz von bPAC ein konstant erhöhter Einstrom von Kationen außerhalb der Messung vermieden, der durch eine konstitutiv aktive AZ bedingt gewesen wäre [240]. Die durch blaulichtadaptierte bPAC erhöhten cAMP-Spiegel würden durch koexprimierte LAPD abhängig von Rotlicht degradiert werden. Die lichtabhängige Änderung der cAMP-Konzentration würde als cAMP/CNG2A-vermittelte Änderung der Membranleitfähigkeit durch Zwei-Spannungsklemmen-Messungen an der Oozyte verfolgt werden. Gleichzeitig würde somit ein optogenetisches Tandem aus den Photorezeptoren bPAC und LAPD erprobt: bPAC und LAPD sind

sowohl bezüglich der Enzymaktivität (AZ gegenüber PDE) als auch der Absorptionsmaxima (blau gegenüber rot) komplementär. Die cAMP-Produktion und -Degradation wären gleichzeitig in einem eukaryotischen Modellsystem durch unterschiedliche Lichtqualitäten zu kontrollieren. Allerdings würde man bei Koexpression von LAPD im bPAC-CNG2A-Kontext bei Blaulichtbestrahlung zunächst eine gleichzeitige Aktivierung von bPAC und LAPD erwarten, da auch LAPD *in vitro* mit 455-nm-Licht maximal aktiviert wurde (s. Abschnitt 3.2.2). Die aktivierte AZ und PDE würden eine resultierende Netto-Aktivität, d.h. -Stromkinetik, ergeben.

Für diese Experimente wurde bPAC-mRNA von M. Stierl (HU Berlin) bereitgestellt. In einem Kontrollexperiment wurden CNG2A- und bPAC-mRNA in einem festen molaren Verhältnis von 1:92 in Oozyten injiziert und wie oben beschrieben zur Expression inkubiert. Die bPAC-Kontrolle ohne LAPD (1:92 bPAC:CNG2A) zeigte mit der Literatur vergleichbare photoaktivierte Membranströme [127,240] und wurde als Ausgangspunkt für die Koexpressions-Bedingungen von LAPD gewählt (Abbildung 35A, schwarze Kurve).

Bei der elektrophysiologischen Messung in Oozyten mit koexprimierter bPAC und LAPD war gegenüber Kontroll-Oozyten ohne LAPD eine veränderte Kinetik cAMP-induzierter Ströme zu beobachten. Das Photorezeptor-Tandem zeigte nach Belichtung kurzlebige Ströme als die Kontroll-Oozyten ohne LAPD (Abbildung 35A, rote Kurve). Während bei der Oozyte ohne LAPD das Basallevel des Stroms nach 1 h, gemessen vom Zeitpunkt des Maximalwerts des lichtinduzierten Stroms, nicht erneut erreicht wurde (Abbildung 35A, schwarze Kurve), war bei Koexpression von bPAC und LAPD der Ruhestrom bereits nach 7-10 min wiederhergestellt (Abbildung 35A, rote Kurve). Die reduzierte Off-Kinetik des lichtinduzierten Stroms ist vermutlich durch die PDE-Aktivität der LAPD bedingt, die die bPAC-Aktivität kinetisch kompensiert. Bei wiederholter Stimulation mit Blaulicht (450 nm) verringerten sich die Stromamplituden, was einer Desensitivierung gleich kam (Abbildung 35A, rote Kurve): Im Vergleich zum ersten lichtinduzierten Stromsignal betrug die zweite Stromamplitude ~32%, die dritte ~12% der ersten bei gleicher Beleuchtungsdauer und -intensität.

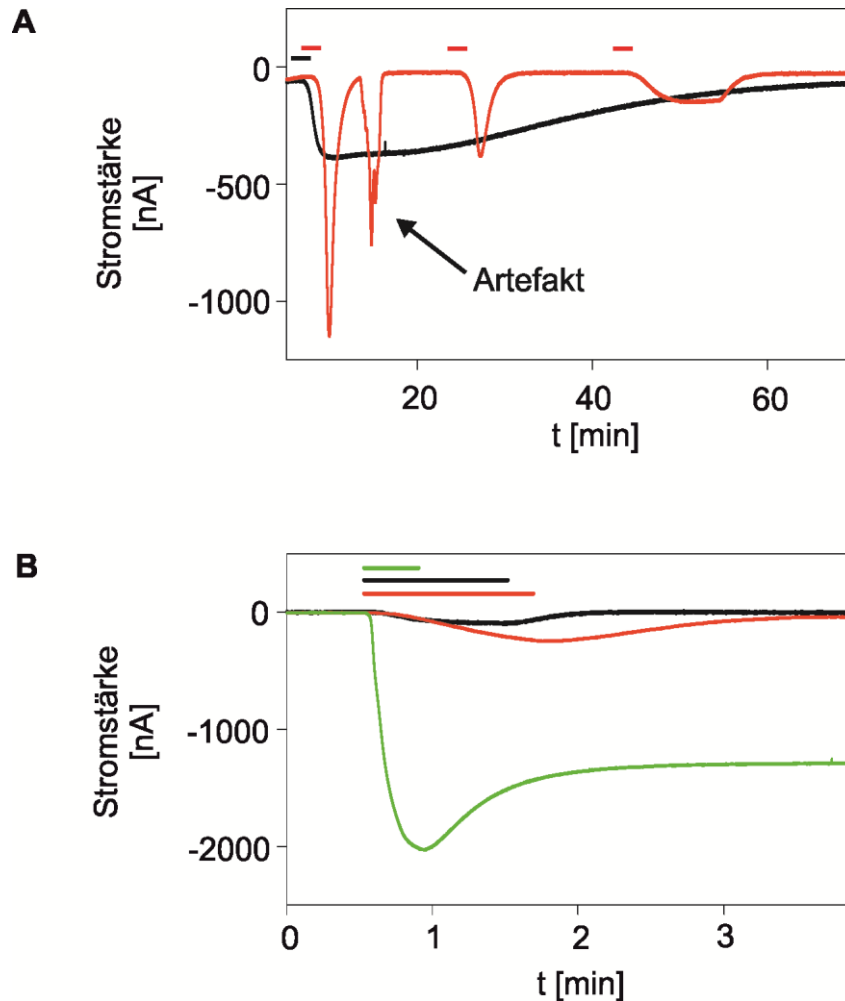


Abbildung 35. Lichtaktivierte CNG2A-Ströme im Oozytenfunktionstest bei Koexpression von LAPD und bPAC. **A.** I-t-Diagramm der Zwei-Spannungsklemmen-Messung in Puffer ORI bei konstantem Membranpotential (-40 mV) und Koexpression von bPAC- und CNG2A-mRNA (molares mRNA-Verhältnis 1:92; 1 Tag Inkubation mit 50 μ M BV) (schwarze Kurve) oder Koexpression von LAPD-, bPAC- und CNG2A-mRNA (molares mRNA-Verhältnis 1:1:92; 5 Tage mit 50 μ M BV) (rote Kurve). Entsprechend farbige Balken markieren die Zeitdauer der Bestrahlung mit Blaulicht (450 nm, Xenonlampe mit Breitbandfilter). Die unterschiedlichen Stromamplituden sind hauptsächlich durch die unterschiedlichen Expressionszeiten zu erklären. **B.** I-t-Diagramm der Zwei-Spannungsklemmen-Messung in Puffer ORI bei konstantem Membranpotential (-40 mV) und Koexpression von LAPD-, bPAC- und CNG2A-mRNA in verschiedenen molekularen mRNA-Verhältnissen: 0,005:1:92 (grüne Kurve); 0,1:1:92 (rote Kurve); 1:1:92 (schwarze Kurve) (4 Tage Inkubation mit 50 μ M BV). Der Start der Blaulichtbestrahlung (450 nm, Xenonlampe mit Breitbandfilter) erfolgte manuell und wurde bei Erreichen des Maximalwerts des lichtinduzierten Stroms beendet; Balken markieren die Dauer der Bestrahlung mit Blaulicht gleicher Intensität der entsprechend farbigen Stromkurve: 22 s (grün), 71 s (rot) und 59 s (schwarz) (vgl. Abschnitt 2.4).

In einem weiteren Expressionsansatz wurde die LAPD-mRNA-Menge auf Grundlage des festen molaren bPAC:CNG2A-Verhältnisses (1:92) variiert. Mit höherer Menge LAPD-mRNA verringerten sich die Stromamplitude und -lebensdauer (Abbildung 35B): Die Expression von LAPD:bPAC:CNG2A im molaren Verhältnis 1:1:92

ergab eine Stromamplitude von ~4% (schwarze Kurve) und im Verhältnis 0,1:1:92 eine von ~12% (rote Kurve) im Vergleich zum lichtinduzierten Stromsignal bei einem Verhältnis von 0,005:1:92 (grüne Kurve). Zwar sind einzelne Oozyten der gleichen Charge aufgrund von Expressionsschwankungen nur bedingt miteinander vergleichbar, doch war eine Korrelation zwischen LAPD-mRNA-Menge und Stromamplitude in diesem Expressionsansatz zu erkennen: Je höher die LAPD-Menge, desto kleiner die Stromamplitude, d.h. desto geringer die Netto-Zyklase-Aktivität von bPAC. In den kinetischen Daten spiegelte sich der gleiche Trend wieder: Beim molaren Verhältnis von 0,005:1:92 (grüne Kurve), wie auch beim Ansatz ohne LAPD (0:1:92; vgl. Abbildung 35A, schwarze Kurve), wurde der Ruhestrom im Beobachtungszeitraum (~13 min; nicht gezeigt) nicht wieder erreicht. Demgegenüber stellte sich während der Off-Kinetik des lichtinduzierten Stroms beim Verhältnis 0,1:1:92 (rote Kurve) nach ~2 min und beim Verhältnis 1:1:92 nach ~40 s (schwarze Kurve) ein Gleichgewichtszustand ein, gemessen vom Zeitpunkt des Maximalwerts des lichtinduzierten Stroms.

Es gelang nicht, die lichtaktivierte Netto-Zyklase-Aktivität, d.h. den Netto-Einwärtsstrom in die Oozyte, experimentell in die Zyklase- und PDE-Aktivität zu zerlegen. Weder durch Zugabe des PDE-Inhibitors IBMX über Inhibition von LAPD im Verlauf der Kinetik der Blaulichtaktivierung (da die Oozyten-Membranströme nicht sensitiv auf IBMX reagierten, s.o.) noch durch alternative Beleuchtungsprotokolle mit Rot- (690 nm) oder Fernrotlicht vor, während oder nach Blaulichtaktivierung wurde eine experimentelle Analyse der kinetischen AZ- und PDE-Komponenten erzielt (nicht gezeigt) (s. Abschnitt 2.4.3). Durch Bestrahlung einer LAPD:bPAC:CNG2A-exprimierenden Oozyte mit FR-Licht während oder nach Blaulicht-Stimulation wäre beispielsweise eine experimentelle Analyse der enzymkinetischen Komponenten, d.h. der Anteile der bPAC- und LAPD-Aktivität am resultierenden Membranstrom, denkbar: Während Blaulichtaktivierung von bPAC und LAPD würde die PDE-Aktivität durch FR-Licht attenuiert (s. Abschnitt 3.2.2), folglich die resultierende AZ-Aktivität und der Membranstrom gesteigert und die LAPD-Aktivität *in vivo* indirekt nachgewiesen werden.

Aufgrund der fehlenden Separation der AZ- und PDE-Aktivität gelang mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an Oozyten kein direkter Nachweis einer lichtinduzierten LAPD-Aktivität *in vivo*. Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass der Anstieg der

cAMP-Konzentration nach blaulichtinduzierter bPAC-Stimulation durch die gleichzeitige blaulichtinduzierte LAPD-Aktivität negativ moduliert wurde. Darauf deuten sowohl die Verkürzung der Off-Kinetik des lichtinduzierten Stroms in der LAPD:bPAC:CNG2A-exprimierenden Oozyte (Abbildung 35A, rote Kurve) als auch die Titration der Stromamplitude sowie der Lebensdauer des lichtinduzierten Stroms über die mRNA-LAPD-Menge im bPAC:CNG2A-Kontext hin (Abbildung 35B).

Die hier erhobenen Daten wurden aus statistisch nicht repräsentativen Stichproben erhoben und stellen daher einen initialen qualitativen Test dar. Zur quantitativen Analyse der LAPD-Aktivität *in vivo* wurde ein alternativer zellulärer PDE-Assay verwendet.

3.4.2 LAPD-Aktivität in einer eukaryotischen PDE-Reporterzelle

Um den direkten Nachweis einer lichtinduzierten LAPD-Abhängigkeit in Eukaryoten zu erbringen, war ein erprobter zellulärer PDE-Assay erforderlich, der eine Trennung von Zykase- und PDE-Aktivierung ermöglichte. Bei den getesteten Bedingungen im Oozyten-Assay waren bPAC und LAPD aufgrund der Überlappung der Aktivitätsspektren stets gleichzeitig aktiviert worden. Ein alternatives eukaryotisches Testsystem war eine CHO-Zelllinie (*chinese hamster ovary*), die als PDE-Reporter konstruiert wurde [213]. Zum einen ließ sich hier die enzymatische cNMP-Synthese lichtunabhängig kontrollieren, um Zykase- und PDE-Aktivität voneinander zu separieren. Zum anderen stand mit BAY-60-7550 ein für dieses System getesteter permeabler PDE2-spezifischer Inhibitor zur Verfügung, um einen lichtabhängigen Effekt als LAPD-spezifisch nachzuweisen. Im Gegensatz zum cAMP-basierten Oozyten-Assay handelte es sich bei dem CHO-System um eine cGMP-Reporterzelllinie, die zur Charakterisierung der zellulären Aktivität von PDE2-spezifischen Inhibitoren verwendet worden war [213]. Die Zelllinie exprimiert stabil den Membranrezeptor für ANP, einen cGMP-sensitiven heterotetrameren CNGA2-Kationenkanal sowie den biolumineszenten Ca^{2+} -Reporter Äquorin (Abbildung 36). Der ANP-Rezeptor katalysiert nach extrazellulärer Ligandenbindung die intrazelluläre Zyklisierung von GTP zu cGMP (vgl. Abschnitt 1.5.1). Der CNG2A-Kanal wiederum bindet das gebildete intrazelluläre cGMP, wodurch dessen Kationenleitfähigkeit erhöht wird und unter Testbedingungen Ca^{2+} -Ionen aus dem Außenmedium einströmen. Äquorin bindet Calcium und katalysiert eine O_2 -abhängige Reaktion von Coelenterazin zu Coelenteramid und CO_2 unter Emission eines Photons (465 nm) [213]. LAPD würde in PDE-Reporterzellen funktional exprimiert werden und nach ANP-stimulierter Syn-

these von cGMP dieses lichtabhängig hydrolysieren. Demzufolge würde lichtadaptierte LAPD die Lumineszenz herabsenken.

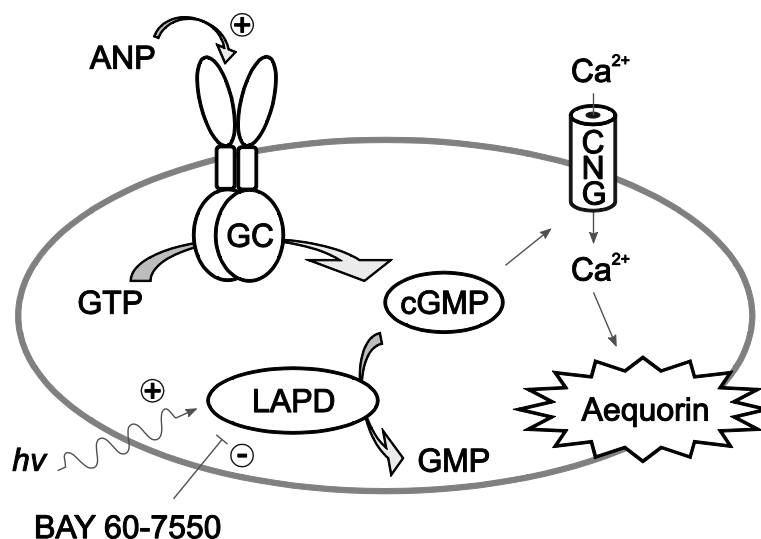


Abbildung 36. PDE-Reporterzelllinie (CHO-Schema) [213]. Die LAPD-Reporterzelllinie exprimiert konstitutiv den ANP-Rezeptor und einen cGMP-spezifischen zyklisches-Nukleotid-gesteuerten Kanal (CNG). Zugabe von ANP induziert die intrazelluläre Synthese von cGMP, das wiederum die CNG-Kanäle öffnet. Der resultierende Calcium (Ca²⁺)-Einstrom induziert die Lumineszenz eines Äquorin-Reporters. Demnach führt die Hydrolyse von cGMP durch lichtadaptierte LAPD zur Schließung von CNG-Kanälen und zu einer Abnahme der Lumineszenz.

Tabelle 6. Erwartete Biolumineszenz im CHO-basierten PDE-Assay basierend auf [213].

PDE-Aktivität	Biolumineszenz
keine	maximal
PDE2A	stark reduziert
LAPD dunkel	schwach reduziert
LAPD belichtet	stark reduziert
LAPD + Inhibitor	maximal

Unter Dunkelbedingungen, d.h. bei basaler PDE-Aktivität, wäre die Lumineszenz schwach reduziert (Tab.6). Bei vollständiger Hemmung durch den spezifischen PDE2-Inhibitor wäre die Lumineszenz maximal. Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte in 96er-Multititerplatten, was eine Biolumineszenz-Messung im Multititerplatten-Lesegerät mit hohem Durchsatz gewährleistete. Im Gegensatz zur elektrophysiologischen Aufnahme erfolgte die Biolumineszenz-Messung im CHO-Assay nicht an Einzelzellen, sondern über das gesamte Zellensemble einer Multititerplatten-Vertie-

fung und wurde über ein Zeitintervall (s) integriert (*static mode* [213], s. Abschnitt 2.3.4). Die Expression von LAPD im CHO-System würde zum einen den Nachweis lichtinduzierter PDE-Aktivität in Säuger-Zellen, zum anderen die Etablierung eines standardisierten eukaryotischen *In-vivo*-Assays für LAPD ermöglichen.

Expression von LAPD in PDE-Reporterzellen (CHO)

Die folgenden Experimente wurden mit Assistenz von J. Pustogowa durchgeführt.

Zur Expression von LAPD im eukaryotischen CHO-System wurde eine *DrBPhy*-PCD-DNA (AS 1-506) generiert, deren Sequenz an die Kodonbenutzung von *H. sapiens* adaptiert war (Geneart; s. Abschnitt 6.4.1). Die adaptierte PCD-Sequenz wurde zunächst über PCR amplifiziert, über Restriktion mit *NheI/HindIII* und Ligation in den leeren pASK43(+)-Vektor eingebaut und als pASK43(+)-*DrBPhy*-PCD kloniert (vgl. 5.4 & 5.4.2). Die bereits von Natur aus an die *H.-sapiens*-Kodonbenutzung adaptierte Sequenz *HsPDE2A*-555-941 wurde über PCR aus dem *HsPDE2A*-cDNA-Klon (imaGenes GmbH, Berlin; s. Abschnitt 6.3) amplifiziert und über Restriktion mit *AfeI/HindIII* und Ligation in den pASK43(+)-*DrBPhy*-PCD-Kontext integriert. Das humanisierte LAPD-Fusionskonstrukt wurde in den Vektor pEGFP-N1 (Clontech, Takara, Mountain View, CA, USA) stromabwärts eines CMV (Cytomegalovirus)-Promotors subkloniert (*NheI/HindIII*); Subklonierung mit dem pEGFP-N1-Vektor ermöglichte eine Expressionsanalyse von LAPD über den C-terminalen EGFP-Fluoreszenztag (*enhanced green fluorescent protein*).

Die Transfektion der CHO-Zelllinien mit pEGFP-N1_LAPD_EGFP erfolgte transient per Lipofektion, d.h. Transfektion über Liposomen aus Lipiden und DNA. Zunächst wurde ein initiales Verhältnis aus Transfektionsreagenz (Fugene, Roche) zu Vektor-DNA von 7:2 ($\mu\text{l}:\mu\text{g}$) eingesetzt, das sich bei Expression von bPAC in CHO-Zellen *Beggiatoa* bewährt hatte [240]. Der Transfektionsansatz wurde mit CHO-Zellen zunächst auf Glasplättchen (50-ml-Zellkultur-Petrischale) inkubiert. Fluoreszenzmikroskopie ($\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 509 \text{ nm}$) zeigte eine sehr schwache LAPD-Expression (Abbildung 37B, D&E). Im Vergleich dazu zeigte eine Kontrolltransfektion von pEGFP-N1 alleine eine stärkere Expression von EGFP; EGFP-exprimierende Zellen traten in der Zellpopulation jedoch nur stark vereinzelt auf (Abbildung 37A&C). Freies EGFP war in der Einzelzelle ubiquitär; dagegen war die Fluoreszenz von löslichem LAPD_EGFP nicht flächendeckend über die Einzelzelle verteilt. Bei maximaler Vergrößerung (30 x) konnten weder bestimmte Komparti-

mente zugeordnet noch die Zellen als intakt oder apoptotisch determiniert werden (Abbildung 37C&D).

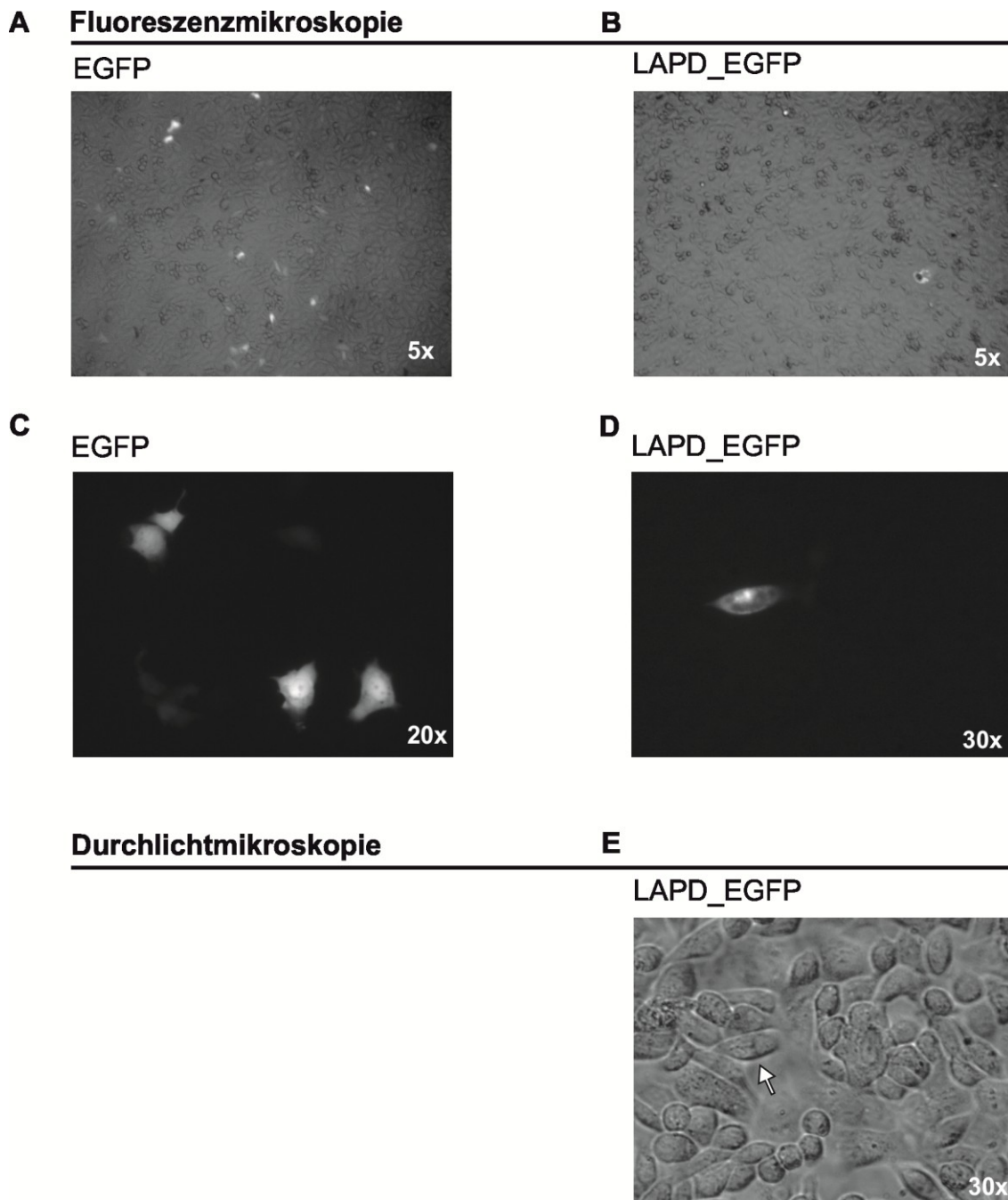


Abbildung 37. Expression von LAPD_EGFP in CHO-Zellkultur (PDE-Reporterzelllinie). CHO-Zellen wurden auf Glasplättchen mit pEGFP-N1_LAPD oder leerem pEGFP-N1-Vektor über Lipofektion (Verhältnis 7 μ l Transfektionsreagenz Fugene (Roche): 2 μ g Plasmid-DNA) transfiziert und inkubiert. Die Analyse der Expression erfolgte über die EGFP-Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Exzitationswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm. **A.** Expression von freiem EGFP durch vereinzelte CHO-Zellen. **B.** Sehr schwache Expression von LAPD_EGFP durch eine CHO-Zelle. **C.** EGFP-exprimierende Zellen in 20-facher Vergrößerung. **D.** LAPD_EGFP-exprimierende CHO-Zelle in 30-facher Vergrößerung. **E.** LAPD_EGFP-exprimierende Zelle (weißer

Pfeil) aus **D** im Durchlicht. **A-E**. Optische Vergrößerungen sind jeweils rechts unten angegeben. Die Aufnahmen erfolgten in Zusammenarbeit mit J. Pustogowa.

Um die LAPD-Expression in CHO-Zellen im höheren Durchsatz zu optimieren und die Biolumineszenz-Messungen für den *In-vivo*-Assay vorzubereiten, wurden die Reporterzellen in 96er-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 1d wurden die Zellen mit pEGFP-N1_LAPD_EGFP durch unterschiedliche Verhältnisse von Transfektionsreagenz zu DNA ($\mu\text{l}:\mu\text{g}$; 3:2-7:4) transfiziert. Nach 2 d Inkubation wurden die Transfektionsansätze zur Holo-LAPD-Rekonstitution *in vivo* 2 h vor Expressionsanalyse mit 25 μM Biliverdin inkubiert (plus BV-Negativkontrolle) (\triangle saturierender BV-Konzentration bei IFP und RFP [157,241]). Anschließend wurde das EGFP-Fluoreszenzsignal über die Zellpopulation im Mikrotiterplatten-Lesegerät-Reader (Tecan) vermessen (vgl. Abschnitte 2.3.3 & 2.3.4).

Das Transfektionsverhältnis von 5:4 ergab eine 1,5-fache Erhöhung der Fluoreszenz im Vergleich zu den Negativkontrollen (0:0 und 0:2) (Abbildung 38). Allerdings war die Expression (EGFP-Fluoreszenz) von LAPD_EGFP um eine Größenordnung schwächer als die von freiem EGFP; diese Beobachtung entsprach den Befunden der Expressionseffizienz in der Zellkultur-Petrischale (s. Abbildung 37). Die Inkubation mit Biliverdin (negativ geladenem Tetrapyrrol) hatte keinen störenden Einfluss auf die Transfektionsreaktion mit Fugene (kationischem Lipid) (Abbildung 38).

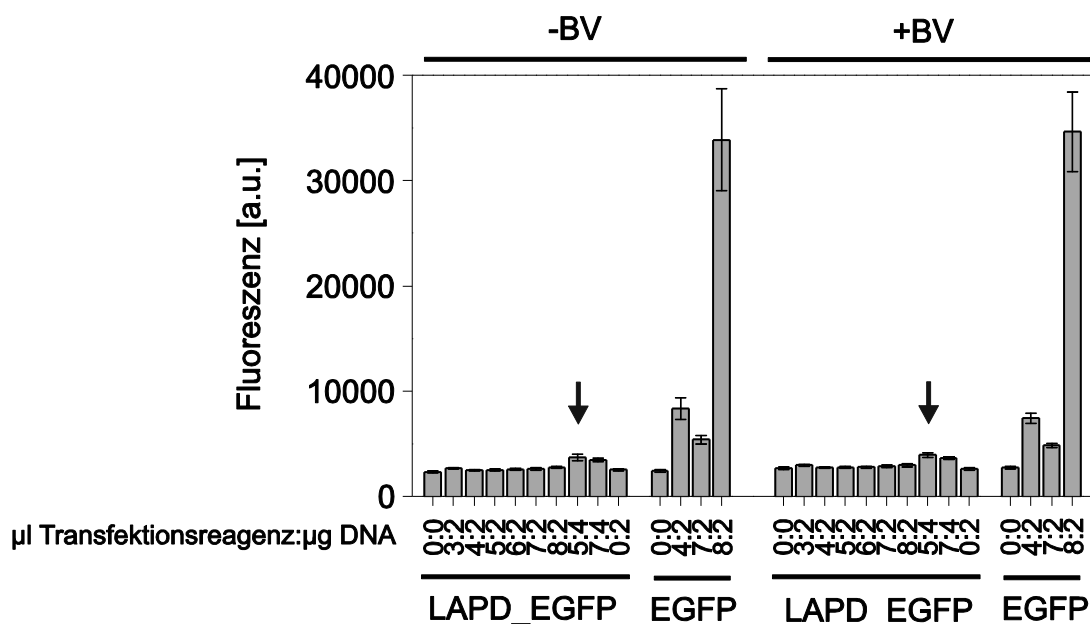


Abbildung 38. Expression von LAPD_EGFP und freiem EGFP in CHO-Zellkultur. PDE-Reporterzellen wurden in 96er-Mikrotiterplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Fugene

(Transfektionsreagenz):Plasmid-Verhältnissen ($\mu\text{g}:\mu\text{l}$) transfiziert; die Inkubation des Expressionsansatzes erfolgte 1d ohne und mit 25 μM BV. Quantifiziert wurde die Expression von freiem EGFP und LAPD_EGFP über die Fluoreszenz im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan): $\lambda_{\text{Ex}} = 480 \text{ nm}$; HWB 9 nm/ $\lambda_{\text{Ex}} = 520 \text{ nm}$; HWB 20nm. Die schwarzen Pfeile zeigen die höchste gemessene LAPD_EGFP-Fluoreszenz bei einem Fugene:Plasmid-Verhältnis von 5:4 an.

Aufgrund der geringen Transfektions- oder Expressionseffizienz von LAPD in CHO-Zellen wurde von der transienten Transfektion abgesehen. Die überwiegend nicht-transfizierten Zellen ohne funktionale LAPD_EGFP-Expression würden nämlich nach ANP-Stimulation ein maximales Lumineszenzsignal erzeugen (Tab.5) [213]. Der geringe Anteil an LAPD_EGFP-exprimierenden Zellen von $\approx 1\%$ würde aber nur einen geringen Teil zur Gesamtlumineszenz des Zellensembles beitragen. Vor der durch ANP stimulierten, hohen Lumineszenz-Intensität wäre eine lichtabhängige LAPD-induzierte Biolumineszenz-Reduktion daher vermutlich nicht zu detektieren.

Stabile PDE-Reporter-Zelllinie (CHO)

Aufgrund der Notwendigkeit einer Expressionseffizienz von $\geq 90\%$ für den CHO-Assay wurde eine stabile Zelllinie generiert. Hierzu wurde die LAPD-Sequenz aus dem pEGFP-N1-Vektor über PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NheI*/*NotI* erneut mit dem pEGFP-N1-Vektor kloniert (vgl. Abschnitte 5.4.1 & 5.4.2), womit der C-terminale EGFP-Tag entfernt wurde. Die Herstellung der stabil-transfizierten CHO-Zelllinie und der entsprechende PDE-Assay wurden von Dr. Frank Wunder und Sandra Taiber (Bayer Pharma, Wuppertal) unternommen [226]: Durch gezielte Selektion über ein Resistenzgen (pcDNA3.1/Hygromycin-Vektor) und über das Biolumineszenz-Signal bei ANP-Stimulation bei Dunkelheit oder Licht wurde ein entsprechender Klon generiert. Somit exprimierte diese Zelllinie LAPD in Zellpopulation quantitativ und war als LAPD-Reporter funktional.

Die PDE-Reporterzelllinie mit stabiler LAPD-Expression zeigte abhängig von der Belichtung im *In-vivo*-Assay deutliche Unterschiede der Lumineszenz-Intensität. Im Dunkeln stieg die Biolumineszenz der LAPD-Reporterzellen mit steigender ANP-Konzentration an. Der apparente EC_{50} -Wert der ANP-Dosis bei dunkeladaptierten Zellen betrug $1,2 \pm 0,1 \text{ nM}$ (ANP) und steht in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert von $0,8 \text{ nM}$ (ANP) zur Stimulation des ANP-Rezeptors [242]. Bei Belichtung wurde nach ANP-Stimulation im Vergleich zu dunkeladaptierten Reporterzellen die Lumineszenz reduziert (Abbildung 39A). Der EC_{50} -Wert des ANP-abhängigen An-

stiegs der Biolumineszenz lag bei belichteten LAPD-exprimierenden Zellen in derselben Größenordnung wie der Dunkelwert ($3,9 \pm 1,0$ nM) (Abbildung 39A). Das Lumineszenzsignal erreichte jedoch maximal 20-35% des Wertes unter dunkeladaptierten Bedingungen; die mit LAPD stabil-transfizierten CHO-Zellen wiesen demnach eine lichtinduzierte LAPD-Aktivität auf. Demgegenüber war die ANP-abhängige Biolumineszenz der *HsPDE2A*-exprimierenden Kontrollzelllinie unabhängig von der Belichtung (Abbildung 39B).

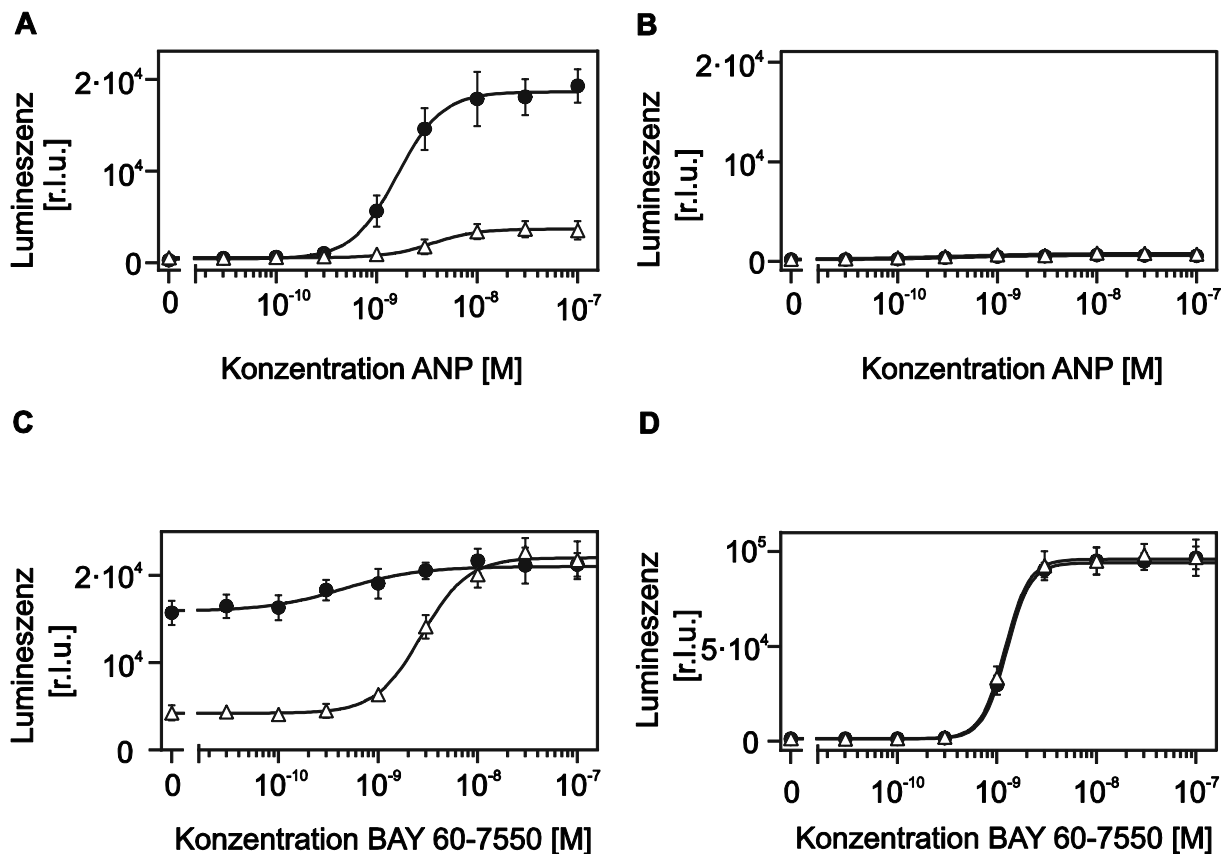


Abbildung 39. LAPD vermittelt lichtaktivierte cGMP-Hydrolyse in CHO-Zellen. **A.** Die LAPD-Reporterzelllinie wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von ANP im Dunkeln (●) oder im Licht (Δ) stimuliert. Das Biolumineszenzsignal wurde im Vergleich zur Dunkelheit im Licht unterdrückt. **B.** Stabil transfizierte Kontroll-CHO-Zellen mit *HsPDE2A3* zeigen bei ANP-Titration eine konstitutive lichtunabhängige PDE-Aktivität (● und Δ). **C.** Titration des PDE2-spezifischen Inhibitors BAY-60-7550 bei fester ANP-Konzentration (10 nM ANP) offenbart spezifische Hemmung der katalytischen LAPD-Aktivität unter Licht- (Δ) und Dunkelbedingungen (●). **D.** Stabil transfizierte Kontroll-CHO-Zellen mit *HsPDE2A3* zeigen keine lichtabhängige PDE-Aktivität (● und Δ). Die Zellen wurden mit 10 nM ANP in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen des PDE2-spezifischen Inhibitors BAY 60-7550 stimuliert. **A-D.** Lumineszenzwerte wurden als relative Licht-Einheiten (r.l.u. - *relative luminescence units*) erfasst und als Mittel \pm Standardfehler von 6-7 Messungen dargestellt. Zur Ermittlung des EC_{50} -Werts wurden die Daten mit hyperbolischer Funktion approximiert (durchgezogene Kurven). Die Messungen wurden von Sandra Taiber und Dr. Frank Wunder (Bayer Pharma AG, Wuppertal) durchgeführt [226].

Um die *In-vivo*-LAPD-Aktivität als Ursache für den ermittelten Lichteffect zu validieren und einen möglichen Beitrag endogener PDEs auszuschließen, wurde der PDE2-spezifische Inhibitor BAY 60-7550 eingesetzt (vgl. Abschnitt 1.5.8). Die LAPD-Reporterzelllinie wurde mit BAY 60-7550 in ansteigender Konzentration inkubiert und bei einer festen ANP-Konzentration von 10 nM stimuliert (Sättigung der Biolumineszenz). Im Bereich unterhalb effektorischer Inhibitor-Konzentration wurde das Ergebnis der ANP-Titration bei 10 nM ANP reproduziert. Im Konzentrationsbereich von BAY 60-7550 bei maximaler Inhibition war die Biolumineszenz nahezu unabhängig von der Belichtung, weil LAPD vollständig inhibiert wurde (Abbildung 39C). Der EC_{50} -Wert $3,0 \pm 0,2$ nM für belichtete Reporterzellen lag in derselben Größenordnung wie der Literaturwert für *HsPDE2A*-WT von 6,0 nM [213]. Im Vergleich dazu war bei *HsPDE2A*-WT-Kontrollzelllinien die Biolumineszenz bzw. PDE-Aktivität von der Belichtung unbeeinflusst (Abbildung 39D). Die lichtabhängige Lumineszenz-Intensität bzw. PDE-Aktivität wurde demnach *in vivo* im eukaryotischen Expressionssystem spezifisch durch funktionale LAPD-Expression vermittelt.

Um den beobachteten Lichteffect zu erhöhen, wurde dem Zellkulturmedium 3 h vor dem PDE-Assay BV zugefügt. Nach dreistündiger Inkubation mit 50 μ M BV wurde jedoch kein Unterschied zu *In-vivo*-PDE-Assays ohne BV gemessen (nicht gezeigt). Demzufolge genügte die Rekonstitution mit endogener Konzentration von BV aus dem zellulären Katabolismus aus, um einen maximalen Lichteffect auszulösen.

4 Diskussion

4.1 Austauschbarkeit, Signaltransduktion und Konstruktion von bestimmten Signalrezeptoren

Die Funktionalität von LAPD belegt, dass die intramolekulare Signaltransduktion zwischen Sensor und Effektor aus den Vorläuferproteinen *DrBPhy*-WT und *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) erhalten bleibt. Da die allosterischen Regulationsmechanismen von *DrBPhy*-WT und *HsPDE2A*-WT vermutlich nicht auf reiner Assoziation/Dissoziation beruhen (140), ist LAPD, wie die rotlichtreprimierte Histidinkinase Cph8, ein synthetischer Photorezeptor der Gruppe II. Somit unterscheidet sich LAPD von den synthetischen Gruppe-I-Photorezeptoren mit pflanzlichen Phy-PCDs, die auf lichtabhängiger Assoziation/Dissoziation basieren (s. Abschnitt 1.4).

4.1.1 Austauschbarkeit von Sensor- und Effektormodulen in bestimmten Signalrezeptoren

Spektrale und photochemische Eigenschaften von LAPD

Die spektralen Eigenschaften des PCD-Moduls von *DrBPhy*-WT bleiben in LAPD qualitativ erhalten, zeigen aber quantitative Abweichungen.

Die qualitativ konservierten spektralen und photochemischen Eigenschaften sind ein Indiz dafür, dass die Struktur des PCD-Moduls in der LAPD-Chimäre größtenteils gewahrt wurde (s. Abbildung 28A, Abschnitt 3.2.1). Die unvollständige Reversion des P_r-Zustandes im Dunkeln nach Rotlichtbestrahlung (s. Abbildung 28E) ist bereits für den Wildtyp *DrBPhy*-WT wie auch für die isolierte *DrBPhy*-PCD beschrieben worden [70,243]. Gleichzeitig war die lichtgetriebene P_{fr}→P_r-Reversion durch Fernrotlicht im Vergleich zur P_r→P_{fr}-Umwandlung durch Rotlicht ineffizient (s. Abbildung 28B). Der Photozyklus von LAPD ist komplexer als auf Grundlage der publizierten Photochemie von *DrBPhy*-PCD ursprünglich angenommen [64,70,110] und noch größtenteils unverstanden.

Quantitative spektrale und photochemische Abweichungen können auf strukturelle Unterschiede zwischen Wildtyp- und Fusionsprotein hindeuten. Zwar unterscheiden sich isolierte *DrBPhy*-WT-PCD und Vollängen-*DrBPhy*-WT spektral und photochemisch nur geringfügig (z.B. bezüglich Q/Soret-Quotienten und Zeitkonstanten der thermischen Reversion; s. Tabelle 4) [110,243]. Damit wäre ein Einfluss der Kopp-

lung an natürliche Histidinkinase oder synthetische PDE auf die Konformation der DrBPhy-WT-PCDs und das UV/vis-Spektrum unwahrscheinlich. Doch der Unterschied im Verhältnis der Absorption von Q (A_{700})- zu Soret (A_{400})-Bande von DrBPhy-WT (~2,7) und LAPD (~1,9) kann durch eine alternative BV-Konformation bedingt sein. Beispielsweise zeigte die photochemisch intakte Einfachmutante DrBPhy-P209G einen mit LAPD vergleichbaren Quotienten (~2,0) [70]. Pro209 in der GAF-Domäne liegt in unmittelbarer Umgebung zum Tetrapyrrol-Ring A. Das veränderte A_{700}/A_{400} -Verhältnis von LAPD kann ein analoger Hinweis auf die Veränderung von Wechselwirkungen des linearen Tetrapyrrols mit der GAF-Bindungstasche sein.

Enzymatische Eigenschaften von LAPD

Die enzymatische PDE-Aktivität von photoaktivierter LAPD lag in derselben Größenordnung wie die von cGMP-aktivierter HsPDE2A-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem).

Die spezifische Aktivität von chimärer rotlichtadaptierter LAPD war ca. sechsmal höher als diejenige von parentaler cGMP-aktivierter HsPDE2A-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) [200]. Trotz unterschiedlicher Assay-Bedingungen sind WT- und Fusions-PDE-Aktivität noch vergleichbar (s. Abschnitt 3.2.2), was belegt, dass die WT-PDE-Aktivität im Fusionskonstrukt konserviert wurde. Die angewendeten Konstruktionsregeln von YF1 [15,137] (vgl. Abschnitt 1.4) konservierten nicht nur die Struktur des photosensorischen Moduls, sondern auch die der katalytischen PDE-Domäne. Im Gegensatz dazu war die Konstruktion von Bakteriophytochrom-basierten Adenylylzyklasen (IlaCs; *near-infrared window light-activated adenylate cyclases*), die während der Entstehung dieser Arbeit veröffentlicht wurde, mit einer Reduktion der Zyklaseaktivität verbunden [244]. IlaCs bestehen aus der N-terminalen *Rhodobacter sphaeroides* BPhy-PCD und der C-terminalen Adenylylzyklase-Domäne von *Nostoc punctiforme* CyaB1 (\triangleq *Anabaena* sp. CyaB1; vgl. Abschnitt 1.5.7). Lichtaktivierte IlaCs erreichten nur eine spezifische Aktivität, die ~330-fach geringer war als diejenige der cAMP-aktivierten Vorläufer-Adenylylzyklase CyaB1 [199] (zum Vergleich entspricht die IlaC-Aktivität in etwa der Dunkelaktivität der blaulichtaktivierten Adenylylzyklase bPAC [240]). Gegenüber vollständig funktionaler LAPD deutet die reduzierte Zyklisierungsreaktion bei IlaCs auf eine Beeinträchtigung der katalytischen Eigenschaften des aktiven Zentrums des AZ-Effektors.

Die duale Spezifität von HsPDE2A-WT bleibt in LAPD erhalten.

Die Hydrolyse von cAMP und cGMP durch LAPD weist nach, dass die duale Spezifität von humaner PDE2A qualitativ konserviert wurde [200]. Quantitativ wurde die Substrataffinität bezüglich cNMPs in der Chimäre reduziert, wie der Vergleich zwischen rotlichtaktivierter LAPD und HsPDE2A-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) zeigt ($340 \pm 20 \mu\text{M}$ bzw. $78 \pm 5 \mu\text{M}$) [200]. Die leicht höhere Affinität von rotlichtadaptierter LAPD zu cAMP als zu cGMP (K_M -Wert $180 \pm 20 \mu\text{M}$ bzw. $340 \pm 20 \mu\text{M}$) steht im Gegensatz zu isolierter humaner PDE2A-Domäne, die die gleiche Affinität für cGMP und cAMP zeigte ($34 \pm 4 \mu\text{M}$ bzw. $32 \pm 8 \mu\text{M}$) [188]. *Bos taurus* PDE2A3 aus dem Herzmuskel (99% Sequenzidentität auf Ebene der Aminosäurereste mit humaner PDE2A-Domäne) hatte umgekehrt zu LAPD sogar eine leichte Präferenz für cGMP gegenüber cAMP ($10 \mu\text{M}$ bzw. $30 \mu\text{M}$) [236].

*Bt*PDE2A degradierte beide cNMPs mit gleicher v_{max} und entsprach damit rotlichtadaptierter LAPD, die cGMP mit einer nur ~2-fach höheren v_{max} als cAMP in der gleichen Größenordnung hydrolysierte. Interessanterweise hydrolysierte jedoch die isolierte humane PDE2A-Domäne cGMP 14-fach schneller als cAMP [188].

Ein Vergleich der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_M [$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$] zeigt aber eine klare Relation; diese integriert v_{max} ($= k_{\text{cat}} [\text{Enzym}]$) und K_M und kann als Maß für die Selektivität gegenüber cNMPs betrachtet werden. Rotlichtadaptierte LAPD hatte gegenüber cGMP und cAMP eine vergleichbare katalytische Effizienz k_{cat}/K_M von $\sim 7,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ bzw. $\sim 6,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$, mit leichter Präferenz für cGMP. Einen vergleichbaren k_{cat}/K_M -Wert von $5,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ zeigte HsPDE2A-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) für cGMP [200]. Entsprechend zeigte die Selektivität von *Bt*PDE2A-WT ebenfalls eine Präferenz für cGMP gegenüber cAMP ($\sim 20,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ bzw. $6,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$) [236], allerdings bei erhöhtem Umsatz im Vergleich zu humaner PDE2A. Auch die isolierte humane katalytische PDE2A-Domäne zeigte eine klare Präferenz für cGMP gegenüber cAMP, mit einem k_{cat}/K_M von $1,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ bzw. $0,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{s}^{-1}$ [188].

Allosterische Regulation von LAPD

Die Kopplung von BPhy- und PDE-Modul resultierte in einer lichtabhängigen PDE-Aktivität.

Der Faktor ~ 6 der Lichtaktivierung von LAPD bezüglich v_{\max} der cGMP-Hydrolyse zeigt (s. Abbildung 29C), dass die Größenordnung des Faktors ~ 4 der cGMP-Aktivierung von *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) konserviert wurde [200] (vgl. Abschnitt 1.5.8). Im Vergleich dazu ergab die analoge Konstruktion von IlaCs der ersten Generation photoregulierte Adenylzyklasen mit Faktoren der Lichtaktivierung von ~ 2 -3 [244]. Das bedeutete eine quantitative Reduktion des Regulationsfaktors ~ 25 der cAMP-aktivierten Vorläufer-CyaB1-WT in den IlaC-Chimären, was auf eine gestörte Signalübertragung von BPhy-PCD zu AZ deutet. IlaCs der ersten Generation bezeichnen die strukturbasierten initialen Linkervarianten; der Regulationsfaktor der AZ-Aktivierung durch Rotlicht von IlaC22 der ersten Generation nach rationalem Entwurf wurde durch zweifache PCR-basierte Zufallsmutagenese und eine anschließende Selektion von ~ 2 auf ~ 6 gesteigert (entspricht IlaC22 k27; IlaC zweiter Generation) [244]. Die entsprechenden Mutationen waren im PCD-Modul, in der Zyklasedomäne sowie in der Linkersequenz lokalisiert; die Regulationsfaktoren der Vorläuferenzyme *RsbphG1* von ~ 11 und *CyaB1* von ~ 25 wurden jedoch nicht erreicht [59,199]. Im Gegensatz dazu zeigte die Linkervariante LAPD(0) ohne Mutagenese, die mit der ersten Generation IlaCs bezüglich der Konstruktionsstufe vergleichbar ist, den vollständigen Erhalt der allosterischen Regulierbarkeit des PDE-Effektors und damit die Konservierung des Signalübertragungsmechanismus des Vorläuferenzym.

Rotlichtadaptierte (R) LAPD wurde durch sättigendes FR-Licht vollständig vom P_{fr}/P_r -Mischzustand zurück in den P_r -Zustand überführt (s. Abbildung 28B, Abschnitt 3.2.1). Dagegen wurde die durch R-Licht maximal aktivierte PDE-Aktivität von LAPD bei analoger FR-Belichtung nicht wieder auf diejenige des P_r -akkumulierten dunkeladaptierten Zustands reduziert (s. Abbildung 31, Abschnitt 3.2.2). Vielmehr verblieben noch 44% der PDE-Aktivität von R-lichtadaptierter LAPD (4-minütige Bestrahlung mit FR-Licht), wohingegen höchstens die PDE-Aktivität der Kontrolle mit einfacher FR-Bestrahlung zu erwarten gewesen wäre, also $\sim 17\%$ der maximalen Aktivität. Die Erwartung stützte sich auf die Annahme, dass alle spektral identischen P_r -Zustände aus verschiedenen Beleuchtungsbedingungen (FR-Licht, R/FR-Zyklus,

dunkeladaptiert) die gleiche PDE-Aktivität besäßen; doch die R/FR-bestrahlte LAPD war ~2,6-fach aktiver als die einfach FR-bestrahlte (s. Abbildung 31, Abschnitt 3.2.2). Die Irreversibilität der PDE-Aktivität kann gegenwärtig nicht abschließend erklärt werden, weil Schlussfolgerungen aus den parental Enzymen für LAPD schwierig zu ziehen sind: a) wurde eine lichtabhängige Histidinkinase-Aktivität von *DrBPhy*-WT nicht gezeigt [21], und b) wurde eine Reversibilität der cGMP-Aktivierung von *HsPDE2A*-WT, d.h. die Deaktivierung bei sinkender cGMP-Konzentration, nicht beschrieben. Ferner wurde eine Irreversibilität der Enzymaktivität bei Wildtyp-Bakteriophytochromen nicht beobachtet. Beispielsweise war nach einem R/FR-Zyklus die Autophosphorylierung von kanonischen *PsBPhy1* und *Agp1* (32 bzw. 33% Sequenzidentität auf Ebene der Aminosäurereste mit *DrBPhy*) mit der Aktivität nach einfacher FR-Bestrahlung vergleichbar (~6-8% Abweichung) [64,81]. Das galt auch für den P_{fr} -Grundzustand des Bathyphytochroms *Agp2* nach einem FR/R- bzw. einfachen R-Zyklus [81]. Somit regulieren BPhy-PCD-Module die natürliche Histidinkinase-Aktivität lichtabhängig reversibel. Die Diskrepanz zwischen spektroskopischen Daten und katalytischer Aktivität bleibt unverstanden und kann nicht erklärt werden. Bezüglich der R/FR-abhängigen PDE-Aktivität lässt sich daher nicht entscheiden, ob die Konstruktion von LAPD Defizite aufweist oder die Wahl dieses speziellen BPhy ungünstig war. Die verwendeten BPhys wurden primär nach Struktur, Sequenz und Absorptionsmaximum (kanonisches Phytochrom oder Bathyphytochrom wie *DrBPhy* bzw. *PaBPhy*), sekundär nach enzymatischen, regulatorischen oder photochemischen Parametern gewählt. Letztere wurden beispielsweise bei der erfolgreichen Konstruktion der Bakteriophytochrom-basierten lichtaktivierten Adenylylzyklasen *IlaCs* berücksichtigt [244] (s.o.). In Folgekonstruktionen wurde bisher keine lichtaktivierte PDE2A mit einem alternativen Bakteriophytochrom generiert, obwohl zahlreiche Kombinationen nach analoger LAPD-Konstruktionsvorschrift sowie Linkervarianten getestet wurden, u.a. *PaBPhy* (Uniprot-ID Q9HWR3), *Corallococcus coralloides* BPhy (Uniprot-ID H8MLG4), *Pseudomonas syringae* BPhy1 und 2 (Uniprot-ID F3IV44 bzw. F3J113) [64], *Rhodopseudomonas palustris* BPhy1 (Uniprot-ID Q6N5G3) [60], *Stigmatella aurantiaca* BPhy1 (Uniprot-ID Q097N3) [245] sowie *Agp1* und 2 aus *Agrobacterium tumefaciens* (Uniprot-ID Q7CY45 bzw. A9CI81) [81] (durchgeführt von C. Schumacher).

Rot- und Blaulicht aktivieren LAPD vollständig.

Neben Rotlicht führen auch Blau- und Weißlicht zu maximaler PDE-Aktivierung von LAPD (s. Abschnitt 3.2.2, Abbildung 31). LAPD zeigte bei Bestrahlung mit Blaulicht im Vergleich zur Adaptation mit Rotlicht jedoch eine partielle P_{fr} -Bildung im photostationären Gleichgewicht (s. Abschnitt 3.2.1, Abbildung 28C). Der vergleichbare cGMP-Umsatz ist nicht durch eine Endprodukthemmung der enzymatischen Reaktion im rotlichtadaptierten Ansatz zu erklären, da in beiden Reaktionen maximal nur ~10% Substrat bis zum Endpunkt (2 min) umgesetzt wurden. Eine mögliche Erklärung ist die Existenz von zwei spektral nicht unterscheidbaren P_{fr} -Zuständen, je nach Beleuchtungsbedingung (sättigendes Rot- oder Blaulicht), von unterschiedlicher PDE-Aktivität. Der Befund lässt sich durch dieses Experiment nicht klären und könnte im Zusammenhang mit der irreversiblen Photochemie stehen.

Ob natürliche Phytochrome auch als Blaulichtrezeptoren eine biologisch relevante Aktivität durch denselben Photosensor modulieren (Soret- statt Q-Bande), bleibt zu klären. Phytochrome mit R/Blau-Photozyklus wurden in Algen beschrieben [22]. Photozyklen von *C. paradoxa* GPS1 und *G. wittrockiana* GPS1 zeigen metastabile Blau- und Rotlicht-absorbierende Photoprodukte, wobei sich die Absorptionsbande im blauen Bereich von der Soret-Bande unterscheidet [22]. Die konzertierte Integration von unterschiedlichen Lichtqualitäten durch entsprechende Photorezeptorklassen ist von biologischer Bedeutung. Beispielsweise ist der Rotlichtrezeptor Phytochrom A über Interaktion mit dem Blaulichtrezeptor Cryptochrom 1 an der Antwort auf blaues Licht von *Arabidopsis thaliana* beteiligt [246].

Apo-LAPD hat eine basale spezifische Aktivität.

Apo-LAPD zeigte mit ~40% der Dunkelaktivität von Holo-LAPD eine basale PDE-Aktivität. Kanonisches *Pseudomonas syringae* BPhy1, eine rotlichtaktivierte Histidinkinase, zeigte als Apoprotein analog dazu ~30% der Autophosphorylierung von Holo-*PsBPhy1* im Grundzustand P_r [64]. Auch das FR-aktivierte Bathyphytochrom *PaBPhy*-WT, auf dem die Konstruktion von LAPD strukturell basiert, zeigte in der Apo-Form eine geringere Autophosphorylierung als Holo-*PaBPhy*-WT im Grundzustand P_{fr} [247]. Im Gegensatz dazu zeigten kanonisches Agp1 und das Bathyphytochrom Agp2 als Apoproteine eine höhere HK-Aktivität als die entsprechenden lichtaktivierten Holoenzyme mit BV-Chromophor [81]. In

unterschiedlichen natürlichen BPhys ist die Aktivität homologer HK-Effektoren in Kopplung mit Apo-PCD-Modulen demnach höher oder niedriger als mit Holo-PCDs. Die basale Aktivität von Apo-LAPD kann in einer von Holo-LAPD verschiedenen Quartärstruktur begründet sein. Apo-DrBPhy-WT zeigte als Volllängenkonstrukt in nativer SDS-PAGE einen heterogenen oligomeren Zustand, anders als das Holoprotein, bei dem das Dimer dominierte [110]. Auch die elektrophoretische Mobilität und Empfindlichkeit gegenüber proteolytischem Verdau von Apo- und Holo-DrBPhy-WT waren unterschiedlich. Unterschiede zwischen Holo- und Apo-LAPD bezüglich des Oligomerisierungsgrades wie auch der hydrodynamischen Eigenschaften könnten eine Erklärung für die unterschiedliche PDE-Aktivität beider Formen liefern.

Austauschbarkeit von Signaldomänen in bestimmten Signalrezeptoren

Die Bakteriophytochrom-Chimären Ilc [244] und LAPD sowie die später beschriebene BphS1 [151] (s. Abschnitt 4.1.3) basieren auf parentalen Signalrezeptoren mit regulatorischen GAF-Domänen-Tandems. In allen drei lichtregulierten Fusionsenzymen, d.h. Adenylylzyklase, PDE bzw. Diguanylatzyklase, haben die photosensorischen BPhy-PCDs die Funktionen der parentalen chemosensorischen GAF-Domänen ersetzt. Analoge Substitutionen chemosensorischer GAF-Tandems zwischen der Adenylylzyklase *Anabaena sp.* (\triangleq *Nostoc punctiforme sp.*) CyaB1 und Säuger-PDEs wurden bereits beschrieben [196,199,248,249]. Neben anderen Modulen wurde das cAMP-bindende GAF-Tandem der CyaB1 durch das cGMP-bindende GAF-Tandem der *Rattus norvegicus* PDE2A-WT ersetzt [199]. Die cAMP-aktivierte CyaB1-WT wurde dabei in eine cGMP-aktivierte Adenylylzyklase transformiert; die Regulationsfaktoren der Aktivierung betrugen ~25 bzw. ~10. Während der K_M -Wert der CyaB1-WT-AZ erhalten blieb, war die spezifische AZ-Aktivität ~100-fach niedriger als die des Wildtyp-Enzyms [199] (vgl. Ilc [244]). Die CyaB1-AZ wurde als Reporterzyklase eingesetzt, um den Einfluss regulatorischer Module von Säuger-PDEs auf eine Enzymaktivität zu beschreiben [248].

GAF-Domänen sind über 2 Milliarden Jahre in der Evolution konserviert worden [103]. Die Konservierung von GAF-Domänenarchitekturen und -Quartärstrukturen beinhaltet vermutlich eine entsprechende Konservierung des Signalübertragungsmechanismus der GAF-Sensormodule, die die Aktivität verschiedener Effektordomänen beeinflussen [17]. Die Konservierung von Struktur

und Mechanismus liefert eine plausible Erklärung für die Kompatibilität von GAF-basierten Sensoren mit diversen GAF-gekoppelten Effektoren. Mit Cph8 (s. Abschnitt 1.4.1), BphS1 [151] (s. Abschnitt 4.1.3), LAPD und IlaC [244] wurden verschiedene C-terminale enzymatische Effektoren unter die Kontrolle von (cyano)bakteriellen PCD-Modulen gestellt. Die Diversität von natürlichen GAF-Effektor-Kombinationen einerseits (Abbildung 40) und BPhy-PCD-Effektor-Kombinationen andererseits (s. Abschnitt 1.2.3, Abbildung 5 & vgl. mit PHY-Familie PF00672; Pfam-Datenbank) offenbart ein analoges evolutionäres Ergebnis durch Genfusion und -spaltung [17]. Anders als Cph8, BphS1 (s. Abschnitt 4.1.3) und IlaCs, die aus Sensor-Effektor-Kombinationen prokaryotischer Proteine hervorgegangen sind, überbrückt LAPD, wie die Reporterzyklen (s.o.) [196,199,248,249], dabei die große phylogenetische Entfernung zwischen einem bakteriellen und vertebreten Enzym.

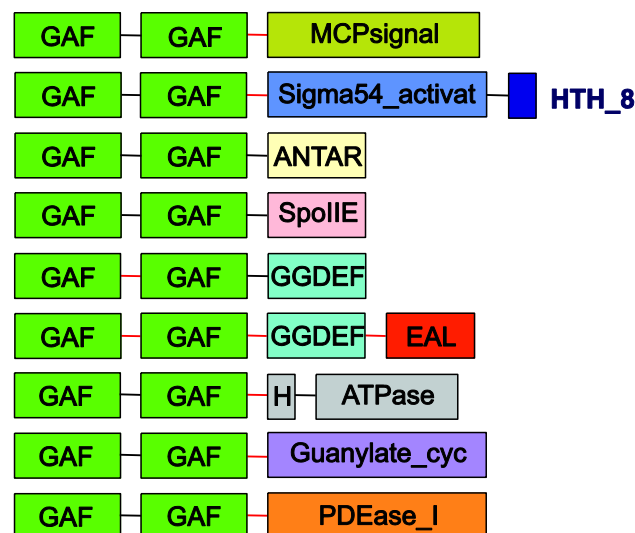


Abbildung 40. GAF-Effektor-Architekturen. Aus 2057 GAF-Domänenarchitekturen (Pfam-Annotation: PF01590) ist eine Auswahl von GAF-Tandems mit diversen Effektordomänen dargestellt (Beispielproteine sind mit Uniprot-ID angegeben): MCPsignal (*methyl-accepting chemotaxis protein*; L0D664_SINAD), Sigma54_activat (*Sigma-54 interaction domain*; B0SC18_LEPBA), ANTAR (*AmiR and NasR transcription antitermination regulators*; I0IPG7_LEPFC), SpoIIIE (*Stage II sporulation protein E*; E8V5S5_TERSS), GGDEF (Diguanylylzyklase, AS-Motiv; W2V704_9GAMM), EAL (c-di-GMP-Phosphodiesterase, AS-Motiv; A0A010QH4_9ALTE), H (Phosphoakzeptor) und ATPase (K9TQC0_9CYAN), Guanylate_cyc (*Adenylate and Guanylate cyclase catalytic domain*; G5J354_CROWT), PDEase_I (PDE6C_MOUSE). Rote Verbindungslinien markieren strukturell gelöste oder vorhergesagte Coiled-Coils. Proteine mit einzelnen oder mehr als zwei GAF-Domänen sind nicht dargestellt.

Dabei stellt die rotlichtreprimierte Histidinkinase Cph8 einen Sonderfall dar, da hier eine sensorische HAMP-Domäne (*histidine kinases*, *adenylate cyclases*, *methyl-accepting proteins and phosphatases*) durch eine nicht-homologe PCD funktional ersetzt wurde [152]. HAMP-Domänen tauchen in sensorischen Modulen allerdings oft in Verknüpfung mit GAF-Domänen auf (s. HAMP-Familie PF00672; Pfam-Datenbank), was die funktionale Kompatibilität von HAMP- und Histidinkinase-Domäne in Cph8 erklären könnte. Jedoch sind spezifische Regulationsfaktoren und mechanistische Details von Cph8 unbekannt [15]. Wie die nicht-homologe Substitution Cph8 (HAMP → PCD) waren auch innerhalb der CyaB1-Reporterzyklen (s.o.) nicht-homologe Substitutionen funktional: Das CyaB1-GAF-Tandem wurde durch die N-terminalen Chemosensoren a) Calmodulin/Ca²⁺-bindende Domänen von HsPDE1A3 und b) UCR-Domänen (*upstream conserved regions 1 & 2*) von HsPDE4D3 funktional ersetzt [196]. CyaB1 wurde somit von einer cAMP-aktivierten in eine durch a) Calmodulin/Ca²⁺ bzw. b) Phosphorylierung aktivierte AZ umgewandelt. Die Konstruktion funktionaler Enzymchimären scheint durch Kombination von Sensor- und Effektmolekülen nicht von einer parentalen homologen Domänenarchitektur limitiert zu sein. Dagegen bestand bei allen bisher diskutierten Vorläuferenzymen die Gemeinsamkeit in der Quartärstruktur: Alle Fusionspartner sind in der parentalen Wildtypform homodimere Enzyme. Darüber hinaus handelt es sich bei LAPD wahrscheinlich um ein Homodimer, dessen Sensor- und Effektmoleküle über Linkerhelizes verbunden sind.

4.1.2 Signaltransduktionsmechanismus von LAPD

Strukturelle Hinweise der Vorläuferenzyme deuten auf den intramolekularen Signaltransduktionsmechanismus von LAPD

Das photosensorische PCD-Modul von LAPD liegt im Dunkeln und im Rotlicht in der akkumulierten P_r- bzw. P_{fr}-Form vor (s. Abschnitt 3.2.1, Abbildung 28A). Gleichzeitig liegt die katalytische Domäne von LAPD in mindestens zwei unterschiedlichen Formen enzymatischer PDE-Aktivität vor (s. Abschnitt 3.2.2, Abbildungen 29 & 30). Bei Dunkeladaptation dominiert die basal aktive, bei Rotlichtbestrahlung herrscht die aktive Form vor (s. Abschnitt 3.2.2, Abbildungen 29 & 30). Eine analoge allosterische Aktivierung wurde für die parentale HsPDE2A-WT beschrieben: Die katalytische Aktivität wird durch cGMP-Bindung an die GAF-B-Domäne des chemosensorischen Tandems stimuliert [218,236].

Hinweise aus der Strukturanalyse von PDE2A-WT.

Auf Basis der Röntgenstrukturanalyse von *HsPDE2A* wurde ein Modell der allosterischen Enzymaktivierung postuliert. Die Kristallstruktur des vollständigen GAF-PDE-Tandems von *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) ohne gebundenen allosterischen Regulator cGMP repräsentiert den Zustand basaler Aktivität und zeigt die sogenannte „geschlossene“ Konformation [200]: Die H-Schleife verdeckt die Substratbindungstasche der PDE-Domäne vollständig, so dass der Zugang für Substrat blockiert ist (s. Abbildung 15C & Abbildung 16, Abschnitt 1.5.9). Im Gegensatz dazu liegt die Struktur der isolierten PDE-Domäne mit Substratanalogen, dem nicht-selektiven PDE-Inhibitor IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin), in der „offenen“ Konformation vor: Die H-Schleife ist disloziert und die Substratbindungstasche mit dem cNMP-Analogen IBMX besetzt (s. Abbildung 15C & Abbildung 16, Abschnitt 1.5.9). Die PDE-Domäne ist für das Substrat zugänglich und maximal aktiv. Übertragen auf LAPD liegt folgende Hypothese nahe (s. Abbildung 41): Die beiden lichtabhängigen Aktivitätsmodi von LAPD, dunkel- und rotlichtadaptiert, entsprechen strukturell den beiden PDE-Konformationen in den Kristallstrukturen, ohne und mit cGMP (PDB-Code: 3IBJ bzw. 3MTU) [200]. Analog zu *HsPDE2A* mit und ohne komplexiertes cGMP liegt LAPD im P_{fr}- und P_r-Zustand vorwiegend in der offenen (aktiv) bzw. geschlossenen (inaktiv) Konformation vor. Die Zustände der sensorischen GAF-A—GAF-B- und PAS-GAF-PHY-Tandems, -/+ cGMP bzw. P_r/P_{fr}, bestimmen Konformation und Aktivität der PDE-Domäne, abhängig von der cGMP-Konzentration bzw. dem R/FR-Verhältnis.

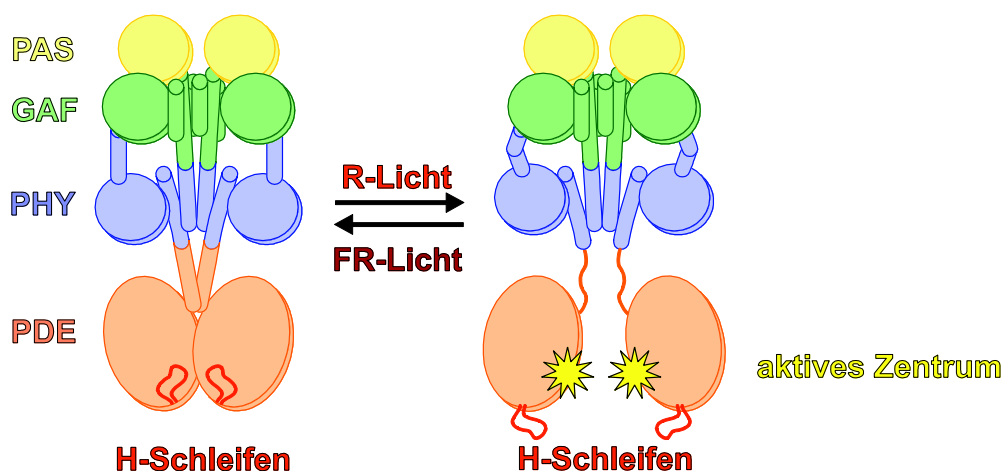


Abbildung 41. Modell der LAPD-Aktivierung, nach [200]. Geschlossene, inaktive Form (links): PCD-Tandem, dunkel- oder FR-adaptiert, und H-Schleifen (rot) verschließen das aktive Zentrum für Sub-

strat. Offene, aktive Form (rechts): PCD-Tandem, R-adaptiert, und H-Schleifen öffnen Zugang für Substrat zum aktiven Zentrum. Im Vergleich zu dunkeladaptierter LAPD besitzt LAPD nach einem R/FR-Zyklus eine intermediäre PDE-Aktivität (vgl. Abbildung 31, Abschnitt 3.2.2).

Die strukturelle Überlagerung des isolierten Maus-PDE2A-GAF-Tandems im Komplex mit cGMP (PDB-Code 1MC0) und des vollständigen humanen GAF-A—GAF-B—PDE-Konstrukts aus *HsPDE2A-WT* ((GAF)₂-PDE-Tandem) ohne cGMP (PDB-Code 3IBJ) zeigte sehr geringe Abweichungen der GAF-A-Domänen im Homodimer (RMSD = 0,8 Å für 130 Cα-Atome) [200] (vgl. Abbildung 42B). Dagegen offenbarte die Überlagerung erhebliche Konformationsunterschiede zwischen den Quartärstrukturen der GAF-B-Domänen (Maus-PDE2A1-GAF- und *HsPDE2A3-WT*-GAF-Tandem teilen 96% Sequenzidentität auf Ebene der Aminosäurereste [218]) (vgl. Abbildung 42B und Abbildung 15B, Abschnitt 1.5.9). Erstens liegen die homodimeren GAF-B-Domänen in der Struktur ohne cGMP parallel vor und bilden eine dichte Dimer-Grenzfläche (s. Abbildung 42B, links). Das GAF-Tandem mit cGMP bildet hingegen einen Überkreuzungspunkt im zentralen helikalen Bündel zwischen GAF-A- und GAF-B-Domäne, so dass die Zentren der GAF-B-Dimerpartner ~62 Å voneinander entfernt sind (s. Abbildung 42B, rechts). Das GAF-Tandem mit cGMP besitzt eine Y-förmige Anordnung, wobei die Dimer-Grenzfläche zwischen GAF-B- und GAF-B'-Domäne des axialen Helixbündels anders als in der Struktur des (GAF)₂-PDE-Tandems ohne cGMP aufgelöst ist. Im Vergleich zum (GAF)₂-PDE-Tandem ohne cGMP ist der Abstand der GAF-B-Zentren im GAF-Tandem mit cGMP um $\Delta l \sim 24$ Å größer (bezogen auf das Cα-Atom von homologen Ala 518 und Ala 494 bei 3IBJ bzw. 3MTU, s. Abbildung 42B). Zweitens ist Helix α_1 im isolierten GAF-Tandem mit cGMP im Vergleich zum (GAF)₂-PDE-Tandem ohne cGMP um 180° gedreht, Helix α_5 um 30° (Abbildung 15B, Abschnitt 1.5.9). Helix α_5 ist unmittelbar mit dem N-Terminus der katalytischen PDE-Domäne gekoppelt. Vorbehaltlich der Unterschiede, die zwischen isoliertem GAF- (PDE-Code: 1MC0) und (GAF)₂-PDE-Tandem (PDE-Code: 3IBJ) bestehen, und der Unterschiede hinsichtlich verschiedener Herkunftsorganismen dieser homologen Proteinspezies aus Maus und Mensch (1MC0 bzw. 3IBJ) sowie bezüglich der unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen und Kristallpackungen, kann folgendes Modell skizziert werden: Die durch cGMP-Bindung induzierte Neuordnung der Dimer-Grenzfläche des chemosensorischen GAF-B-Dimers wird auf die PDE-Domäne übertragen. Die Konformationsänderung

wird vermutlich über das zentrale Helixbündel übertragen, resultiert in der Neuordnung der Quartärstruktur des PDE-Dimers und setzt die H-Schleifen frei [200].

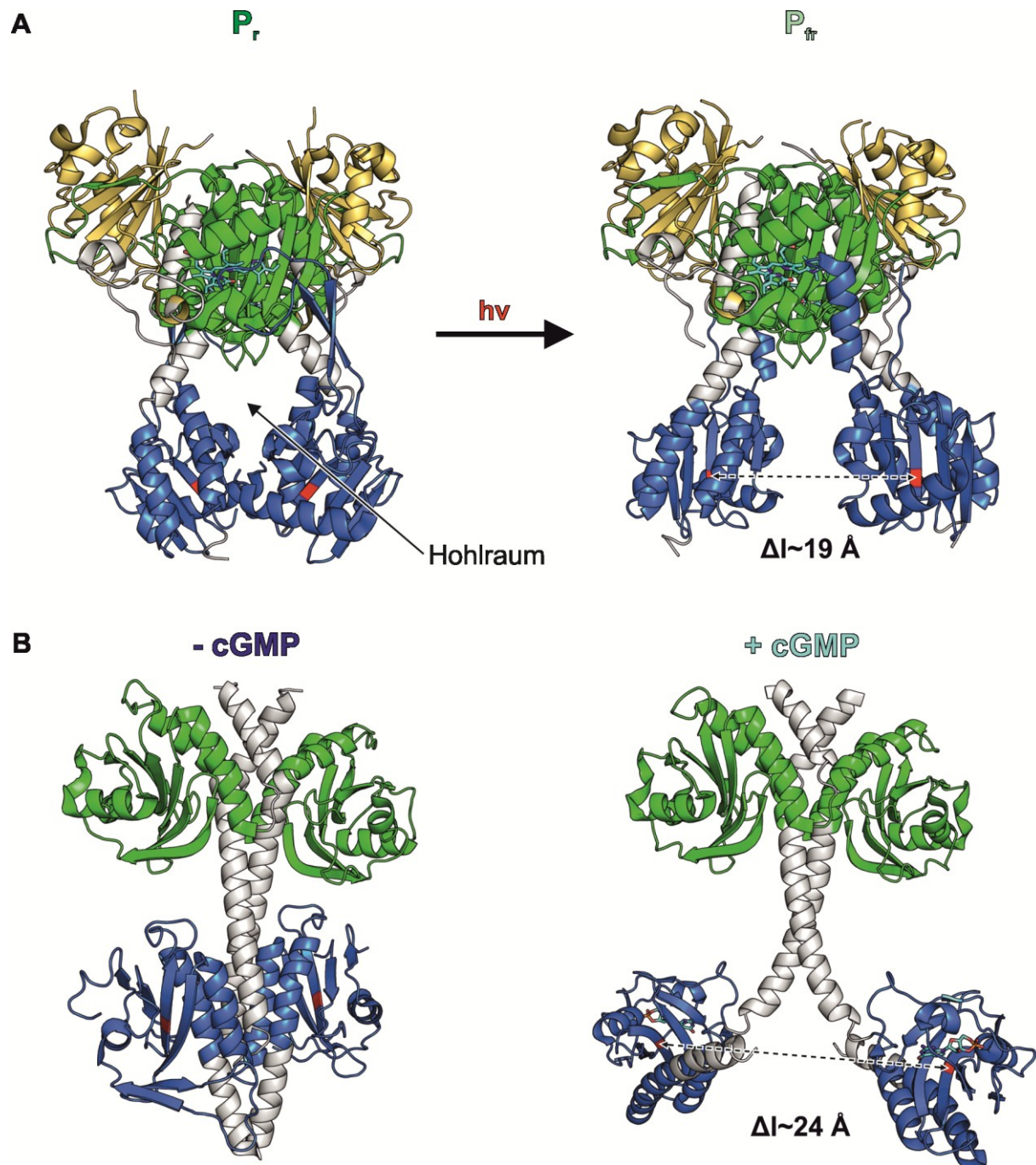


Abbildung 42. Strukturen der regulatorischen Tandems von *DrBPhy* und *HsPDE2A*. **A.** PCD-Modul von *DrBPhy* (PAS – gelb, GAF – grün, PHY – blau) in dunkel- (links) und rotlichtadaptiertem (rechts) Kristall (PDB-Code: 4O0P bzw. 4O01) [250]. In der P_r -Form bilden GAF- und PHY-Domänen einen zentralen Hohlraum aus. Die Abstandsänderung der PHY-Domänen-Zentren ($C\alpha$ -Atom von Leu 438, rot) im Dimer zwischen dunkel- und rotlichtadaptierter Struktur ist eingezeichnet (gestrichelter Doppelpfeil). **B.** GAF-Tandem von *HsPDE2A* ((GAF)₂-PDE-Tandem; GAF-A – grün, GAF-B – blau) ohne (links) und mit GAF-B-gebundenem cGMP (isoliertes (GAF)₂-Tandem; rechts)

(PDB-Code: 3IBJ [200] bzw. 1MC0 [218]). Der Abstandsunterschied der GAF-B-Domänen-Zentren (C α -Atom von Ala 518 bzw. Ala 494, rot) im Dimer zwischen beiden Strukturen ist eingezeichnet (gestrichelter Doppelpfeil).

Hinweise aus der Strukturanalyse von *DrBPhy*-PCD-WT.

Die Konformationsunterschiede der GAF-B-Domänen mit und ohne cGMP ähneln der Neuordnung der PHY-Domänen des vollständig strukturell gelösten *DrBPhy*-PCD-Moduls, die sich beim Übergang vom dunkel- in den lichtadaptierten Zustand ereignet [250]; diese Strukturen standen in der Planungsphase der LAPD-Konstrukte noch nicht zur Verfügung. Lokale lichtabhängige Konformationsänderungen nach Photoisomerisierung von BV bewirken die Umordnung der PCD (vgl. Abschnitt 1.2.11). Diese umfasst eine Sekundärstrukturänderung der PHY-Zunge, die direkt mit dem Chromophor und der GAF-Domäne interagiert [112]. Die lichtgetriebene Transformation des Schleifenstamms von β -Faltblatt (im P_r-Zustand) nach α -Helix (im P_{fr}-Zustand) geht mit einer Verkürzung der Verbindung zwischen PHY- und GAF-Domäne um 2,5 Å einher (vgl. Abschnitt 1.2.11). Die Verkürzung löst eine globale Änderung der Quartärstruktur der homodimeren *DrBPhy*-PCD aus: Ausgehend von einer geschlossenen, näherungsweise parallelen Anordnung der P_r-Form im dunkeladaptierten Kristall nehmen die PHY-Domänen der P_{fr}-Population unter R-Licht eine offene Konformation an (s. Abbildung 42A) [250]. Das R-belichtete PCD-Modul hat eine Y-förmige Konformation, wobei sich die PHY-Domänen um ~3 nm voneinander entfernen [250]. Die Messung des Abstands der PHY-Zentren (C α -Atom von Leu 438) in dunkel- und rotlichtadaptierter *DrBPhy*-PCD-Struktur ergab einen Längenunterschied von $\Delta l \sim 19$ Å (PDB-Code: 4O0P bzw. 4O01) (s. Abbildung 42A). GAF-B-Ala 518 (s.o.) und PHY-Leu 438 entsprachen im strukturellen Alignment zum LAPD-Entwurf einander (vgl. Abbildung 20B, Abschnitt 3.1.1 und Abschnitt 5.1.1). Die Unterschiede in den molekularen Abständen stehen somit in guter Übereinstimmung: $\Delta l \sim 24$ Å bei GAF-B gegenüber $\Delta l \sim 19$ Å bei *DrBPhy*-PHY (s. Abbildung 42).

Strukturelle und mechanistische Analogien in LAPD.

Die strukturelle Analogie der Grund- und Signalzustände von *DrBPhy*-WT-PAS-GAF-PHY und *HsPDE2A*-WT-GAF-A—GAF-B liefert eine mögliche Erklärung für die funktionale Kompatibilität von PCD-Sensor und PDE-Effektor in LAPD: cGMP im chemosensorischen GAF-Tandem und Rotlicht im photosensorischen PCD-Modul bewirken eine analoge Konformationsänderung der regulatorischen Module (Parallel-

Form → Y-Form). Diese wird in eine entsprechende Konformationsänderung der PDE-Domänen, d.h. Dimerumordnung und Freisetzung der H-Schleifen, und damit in eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität übersetzt. Dass die Y-förmige Öffnung der PHY-Domänen nicht nur im isolierten PCD-Artefakt, sondern auch im Volllängen-*DrBPhy*-WT geschieht, wird durch Dunkel-Licht-Differenz-Signale von SAXS-Messungen (*small-angle X-ray scattering*) untermauert [251]. Die Änderungen der molekularen Abstände im relevanten Größenbereich der PHY-Translation von ~3 nm waren im Volllängen- und PCD-Konstrukt von *DrBPhy*-WT vergleichbar. Analog könnte auch in LAPD die PHY-Umordnung erhalten geblieben sein, so dass die strukturelle Analogie der parentalen Sensor-Module in der Chimäre die quantitative Konservierung des Regulationsfaktors begünstigt haben könnte.

Neben den Gemeinsamkeiten bestehen jedoch auch strukturelle Unterschiede. Im Gegensatz zu *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) ohne cGMP (3IBJ), in der eine durchgängige axiale Dimer-Grenzfläche dichter Packung besteht [200], zeigt die *DrBPhy*-PCD in der dunkeladaptierten P_r-Form (4O0P) einen zentralen Hohlraum (Abbildung 42A), der von beiden Untereinheiten zwischen GAF- und PHY-Domänen geformt wird [250].

Allerdings bleiben strukturelle Analogien und Unterschiede der parentalen Konstrukte nur Hinweise für die Signaltransduktion in LAPD. Die globalen Konformationsänderungen unterscheiden sich vermutlich zwischen den isolierten Sensordomänen und den entsprechenden Volllängenproteinen. Bei letzteren ist nämlich die Signalübertragung um die Dimer-Grenzfläche der Effektordomänen Histidinkinase oder PDE erweitert [250]. Ob und wie eine Öffnung der isolierten GAF-basierten Sensordomänen in den Volllängenkonstrukten *DrBPhy*-WT, *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) und LAPD auf die Effektordomänen übertragen wird, bleibt strukturell und mechanistisch zu klären [95,243].

Kopplung von Sensor- und Effektormodulen in Signalrezeptoren über Coiled-Coil-Linker

Für das LAPD-Dimer werden zwei durchgängige Helizes zwischen PCD und PDE angenommen, weil a) für *DrBPhy*-WT eine durchgängige Linkerhelix zwischen PCD- und Histidinkinase-Modul vorgeschlagen wurde [35,95] und b) die Struktur von *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem; PDB ID: 3IBJ) einen kontinuierlichen Coiled-Coil-Linker zwischen sensorischem GAF-Tandem und PDE-Domäne zeigt [200]. Ob die C- und N-terminalen Helizes von PCD- bzw. PDE-Modul einen helikalen Linker in der Fusion LAPD konstituieren, bleibt jedoch durch Strukturanalyse zu klären. Die empfindliche Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Linkerlänge in LAPD-Varianten zeigt, dass die Art der Kopplung von PCD-Modul und PDE-Domäne entscheidend für die Signaltransduktion in der Chimäre ist (s. Abbildung 32, Abschnitt 3.3.1). Ein starkes Indiz für einen Coiled-Coil-Linker ist die Korrelation von Heptadenperiodizität und effektorischem Aktivitätsmuster der Linkervarianten, wie für bestimmte Signalrezeptoren wie YF1 ermittelt wurde [137,143,234] (vgl. Abschnitt 1.4). Im Gegensatz dazu offenbarten die LAPD-Linkervarianten in den aktuellen Messungen keine Heptadenperiodizität der D/L-Aktivität der PDE. Die vergleichbaren IlaCs hingegen zeigten eine Korrelation der Helixphase mit dem Aktivitätsmuster [244]: Mehrere lichtaktivierte und -reprimierte Adenylylzyklase-Varianten wurden gefunden, die sich um 3-4 Aminosäurereste innerhalb des Linkerbereichs unterschieden. Das entspricht in etwa einer Helixwindung (3,6 und 3,5 Aminosäurereste in der α - bzw. Coiled-Coil-Helix) [144,252]; d.h., funktionale Chimären hatten also im Homologiemodell die gleiche helikale Phase (s. Abbildung 46B, Abschnitt 4.1.3).

Die Signalhelix.

Die Vorläuferenzyme von Cph8, YF1 und LAPD gehören zu prokaryotischen und eukaryotischen Signalrezeptoren, deren Sensor- und Effektor-Domänen, wie z.B. HAMP, PAS und GAF bzw. Histidinkinase und Phosphodiesterase, vermutlich über helikale Coiled-Coils verbunden sind [114]. Dieser wiederkehrenden sogenannten S-Helix (S = Signalling) wird die Übertragung des Signalfusses stromabwärts vom Sensor zum Effektor zugeordnet. Ein wiederkehrendes Signalmotiv ist die Drosselung einer Effektoraktivität durch die S-Helix in Abwesenheit eines Stimulus am Chemosensor-Modul, wie z.B. bei der PAS-gekoppelten Sauerstoff-regulierten Histidinkinase *BjFixL* in Abwesenheit von O₂ (s. Abschnitt 1.4) [253], bei der HAMP-gekoppelten osmoregulierten Histidinkinase *E. coli* EnvZ bei niedriger Osmolarität (s.

Abschnitt 1.4.1) sowie bei der membrangebundenen Guanylylzyklase, dem vertebra-ten ANP-Rezeptor ohne ANP [114]. Auch auf die natürliche *HsPDE2A*-WT trifft diese allosterische positive Regulation zu. Wie Cph8, YF1 und LAPD wurden andere synthetische Signalrezeptoren zwischen homodimeren Vorläuferenzymen innerhalb der S-Helix realisiert. So wurden sensorische HAMP-Domänen mit effektorischen Adenylylzyklase- und MCP-Modulen (*methyl-accepting chemotaxis protein*) aus Prokaryoten funktional gekoppelt. Die Fusionsstellen wurden dazu anhand der Heptadenperiodizität von HAMP-Domänenlinkern bestimmt [254,255]. Wie bei YF1 zeigten Linkervarianten eine Heptadenperiodizität der Aktivität, Regulation und Signalpolarität [137,234].

Aufgrund ihrer Länge und starren Struktur wurde α -Helizes die Übertragung von Konformationsänderungen über längere intramolekulare Entfernungen während des Signaltransduktionsprozesses vom N-terminalen Sensor zum C-terminalen Effektor zugeordnet [114]. Ein LAPD-Mechanismus ist vorstellbar, in dem Helixbewegungen die Signaltransduktion zwischen PCD-Modul und PDE vermitteln. Für diese Signalprozesse sind Rotations-, Dissoziations-, Kolben- und Drehgelenk-ähnliche Translationen vorgeschlagen worden [17]. Dagegen deutet das Modell zur *HsPDE2A*-WT-Aktivierung ((GAF)₂-PDE-Tandem) eine Entfaltung der Linkerhelix LH2 nach Dimerumordnung der sensorischen GAF-B-Partner an [200] (s. Abbildung 16, Abschnitt 1.5.9). Sowohl der Zusammenbruch des Coiled-Coils als auch die Translation der Konformationsänderungen über intakte Signalhelizes sind denkbar, um Änderungen der Quartärstruktur zu bewirken [17], die letztlich die PDE aktivieren. Die strukturelle Analyse der LAPD-Signalzustände, P_r und P_{fr}, könnte den Mechanismus der Signalübertragung klären (s. Abbildung 41).

Mögliche Gründe für die fehlende Heptadenperiodizität in LAPD.

Die nicht detektierte Heptadenperiodizität der Enzymaktivität der LAPD-Linkervarianten (s. Abbildung 32, Abschnitt 3.3.1) könnte enzymatisch durch einen geringen dynamischen Bereich sowie durch die geringe spezifische Aktivität der Linkervarianten und experimentell durch die begrenzte Sensitivität des HPLC-basier-ten PDE-Assays zu erklären sein.

Die fehlende Heptadenperiodizität der PDE-Aktivität der LAPD-Linkervarianten kann jedoch auch intrinsische strukturelle Ursachen haben, die in der Vorläufer-Histidinkinase (HK) und -PDE an sich begründet sind. Das Regulationsmuster der

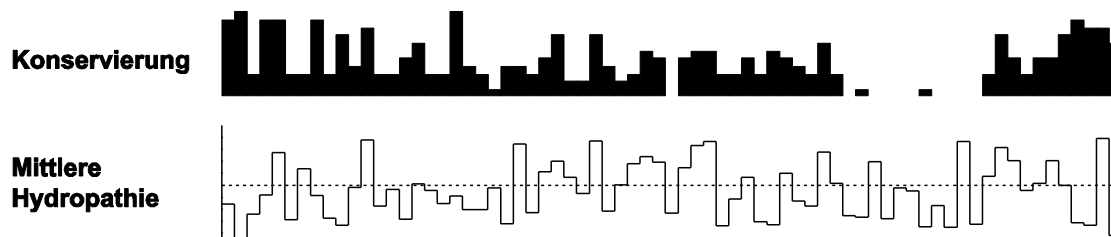
YF1-Linkervarianten wurde mit einer Coiled-Coil-Sequenz erklärt: Ein multiples Sequenzalignment innerhalb der Domänenarchitektur PAS—HK ergab ein regelmäßiges heptadisches Muster der über die Sequenzen gemittelten Hydropathie im Linkerbereich (hydrophobe Aminosäurereste a und d in der Folge abcdefg). Die Sequenzen bildeten dabei Linkerpopulationen, die sich diskret um $7n$ Aminosäurereste (\triangle Heptade) unterschieden [137] (vgl. Abschnitt 1.4). Ein multiples Alignment sämtlicher Linkersequenzen der natürlichen Domänenarchitekturen PHY—Histidinkinase und GAF—PDEase zeigte lediglich kurze amphiphile Helizes ohne Heptade (Abbildung 43). Es ist folglich anzunehmen, dass deshalb auch kein heptadisches Muster der Enzymaktivität der LAPD-Linkervarianten beobachtet wurde. In der *HsPDE2A*-WT-Struktur ((GAF)₂-PDE-Tandem) scheint der Coiled-Coil-Linker auch über polare Wechselwirkungen der Dimer-Grenzfläche stabilisiert zu sein (s. PDE ID: 3IBJ: H550, Y554, V557, Q561, ggf. S564) (Abbildung 44A). Auch das zentrale Helixbündel zwischen *PaBPhy*-GAF und -PHY-Domäne wird ebenfalls über polare Interaktionen stabilisiert, nämlich über intra- und intermolekulare Arginin- und Glutamatreste (Abbildung 44B). Die Abweichungen vom klassischen Coiled-Coil-Sequenzmotiv sind eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden enzymatischen Befund (s. Abbildung 32, Abschnitt 3.3.1).

Weiter könnte das Muster der Enzymaktivität vom enzymatischen Mechanismus des gekoppelten Effektor-Moduls abhängen. Die postulierte lichtinduzierte Monomerisierung der PDE-Domänen, d.h. Dislokation der H-Schleifen [17,200], hängt weder von Helixhöhe noch -winkel ab. Die lichtinduzierte Umordnung der HK-Domänen von YF1, d.h. die Ausbildung der Phosphotransfer-Geometrie [143], und der AZ-Domänen von *IlaCs*, d.h. die Ausbildung der katalytischen Dimer-Grenzfläche [256] (vgl. Abschnitt 1.3), zeigt eine strikte heptadische bzw. helikale Abhängigkeit [137,244].

A

Phytochrom-HisKA

		Helix	
<i>Q6IFT1_NEUCS</i>	PRNSFKKWTEVVDGTSKAWISIEHTNLAAMAQLLYG--SFICVWREKETAINDTRLKR----LLLHDASHQVR		708
<i>G2Y9A1_BOTF4</i>	PRASFKRWSQHVMGTSREWTREQVESAGVLSALYG-RFIEVWROKEAIVQQNRMTTR----LLIRQAGAEVR		706
<i>Q0U6W3_PHANO</i>	PRKSFKTWSETVVGKCREWTEEEVETASVLCVLYG-KFIEVWROKEAALQSSQLTR----LLLANSAHEVR		820
<i>G1XTB9_ARTOA</i>	PRKSFKIWSETIVGSKWETDDEVETAIVLCVLYG-KFIEVWROKEAALQTSQLTR----ILLANASHEVR		753
<i>B8LYL7_TALSN</i>	PRKSFQTWRETVLSRSREWSETDIETAIVLCVLYG-KFIEVWROKEAAMQSTQLTK----LLLANSAHEVR		799
<i>G7DZB3_MIXOS</i>	PRKSFKMWSETVRGQCRAWTDDELETSVLCVLYG-KFISVWREKQAAVQTSQLTN----LLLSNASHEVR		988
<i>E6RD50_CRYGW</i>	PRKSFKAWTETVTGCSRSWTDDELESAGVLALIYG-KFIHVWREKOTAMASNQLTA----ILLNTSHAVR		1289
<i>G8AZK3_AZOBR</i>	PRTSFETWKETVRHRALPWTAAERDTAAALRHAVIGIVLRKAEELASLSRELARSNKELESFSYSVSHDLR		544
<i>Q6N5G2_RHOPA</i>	TRASFEAWREEVRDRSRPWSHEIVAAEEIRDVLVDVILGRAEELANANRELSRSNDELESFAYVAADHLK		550
<i>D0LRI6_HALO1</i>	PRKSFALWEEIVRGSRQPWTPLELEMVRRRLRNAVATAALQDAQLRRLNAELARSNEDLDAFAYVASHDLK		562
<i>PHY1_SYNY3</i>	PRQSFDLWKEIVRLQSLPWQSVEIQSALAIKKAIVNLILRQAEELAQALARNLERSNADLKKFAYIASHDLO		541
<i>H0SNP3_9BRAD</i>	PRNSFAQWKESVAGSRPWLEHEREAAQNLGRALLDVRLTOLEKIEKANRELTEINTELDSEFAYAASHDLK		544
<i>Q9RZA4_DEIRA</i>	PRHSFDTYLEEKRGYAEFWHPGEIEEAQDLRDLTLTGALGERLSVIRDLNRALTQSAEWRYQGVFVISHMQ		535
<i>A3XMS7_LEEBM</i>	PRKSFEAWSVQQEGKSAPWQYEYETAAEALKQDISEIILEKYDEIKELHNLKVAYEDELTFSSVVAHDLR		531
<i>BPHY_PSEAE</i>	PRGSFEAWEEVVRGHSTPWSSETDLAIAEKLRDLMLCLNHAEEVDRMR-----QRLIAVLGHDLR		516



B

GAF-PDEase

		Helix	
<i>PDE2A_HUMAN</i>	VAELVNKIN---GPWFSKF-DEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHLANEMMMY		573
<i>H2TEI4_TAKRU</i>	VAELVNKMN---GPWFNRN-DEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKRVHEAQFRSHLANEMMMY		279
<i>F6VJU1_XENTR</i>	VAELVNKIN---GPGFTKF-DEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKQVREAQFRSHLANEMMMY		549
<i>I1FCX1_AMPQE</i>	VAQLVNKKG---GRFFTKY-DEELAIISFSVYCGISLHAMLYKNVRLEQSSQLATELMLY		525
<i>PDE10_MOUSE</i>	VVQMVNKIS---GSAFSKT-DENNFKMFAVFCALALHCANMYHRIRHSECIYRVIMEKLSY		441
<i>H2TXD1_TAKRU</i>	VVQMVNKLK---GCAFTKT-DENNFKMFAVFCALALHCANMYHRIRHSECIYRVIMEKLSY		448
<i>D6W8L5_TRICA</i>	VVQVVNKin---GGYFTNT-DEDLFKTFVYCALALHYTKVNQQMMKMMHVSNISLKLRL		395
<i>PDE5A_BOVIN</i>	VCQLVNKMEETTGKVKAFNRNDEQFLFAFVIFCGLGIQNTQMYEAEVERAMAKQMTLEVLSY		518
<i>G3W5Y3_SARHA</i>	VCQLVNKMEENSCKKFPNRNDEQFLFAFVIFCGLGIQNTQMYEAEVERAMAKQMTLEVLSY		549
<i>F6YX00_XENTR</i>	VCQLVNKVDENSGKIKAFNKNDQFLFAFVIFCGLGIQNTQMFVVERAMAKQMTLEILSY		261
<i>F1QZ12_DANRE</i>	VCQLVNKMEASGEVKAFNRNDEQFLFAFVIFCGLGIQNTQMYEAEVERAMAKQEVTELEVLSY		526
<i>PDE11_RAT</i>	VAQVLNRLDG----KPFDDADQRLFEAFVIFCGLGINNTIMYDQVKKSWAQSVLDVLSY		583
<i>F1QJD6_DANRE</i>	VAQILNRLDR----KTFNDADQRLFEAFVIFCGLGINNTIMYDQVKKSWAQSVLDVLSY		535
<i>PDE6A_HUMAN</i>	VATFYNRKDG----KPFDEMDLTLMESLTQFLGWSVLNPDITYESMNKLENKRDIFQDIVKY		456
<i>F6V645_XENTR</i>	VATFYNRKDG----KPFDEMDLTLMESLTQFLGWSVLNPDITYEKMNKLENKRDIDQDMVNY		247
<i>PDE6B_BOVIN</i>	VATFYNRKDG----KPFDEQDEVLTLMESLTQFLGWSVLNPDITYDKMNKLENKRDIAQDMVLY		454
<i>E7F5I9_DANRE</i>	VATFYNRKDG----KPFDEHDEQLMEALTLQFLGWSALNTDITYDKMNKLENKRDIAQDMVLY		455
<i>PDE6C_HUMAN</i>	VATFYNRKDG----KPFDEHDEYITETLTQFLGWSLNTDITYDKMNKLENKRDIAQEMLMN		458
<i>Q0VI99_LEIBR</i>	VVQLVNKLNEAGE-VTVFTESDRETRFVSLFAGISINNSHLLFAVNAKAGREMTLNQRL		575
<i>Q6S997_LEIMA</i>	VVQLVNKLGGDGS-VTCTFTPDQETFKVFSLFAGISINNSHLLFAVNAKAGREMTLNQRL		575

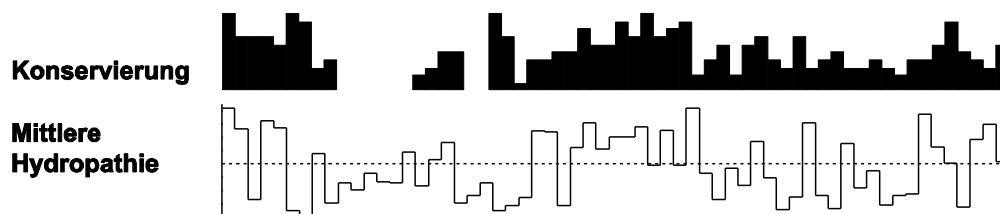


Abbildung 43. Multiple Sequenzalignments der Linkerregionen innerhalb von PHY—Histidinkinase (HK)- und GAF—PDE-Domänenarchitektur. A. Auswahl aus 203 Linkersequenzen aus PHY—HK-Architekturen (Pfam-Annotation: PF00360 bzw. PF00512). Helikale Strukturen in PaBPhy (PDE-Code: 3C2W) sind markiert. **B.** Auswahl aus 449 Linkersequenzen aus GAF—PDE-

Architekturen (Pfam-Annotation: PF01590 bzw. PF00233). Helikale Strukturen in *HsPDE2A* (PDE-Code: 3IBJ) sind markiert. Die multiplen Sequenzalignments wurden mit ClustalX 2.0 erstellt [41] und mit dem Programm Jalview dargestellt. Die Konservierung und mittlere Hydropathie über alle Sequenzen zeigen kein charakteristisches Heptadenmuster.

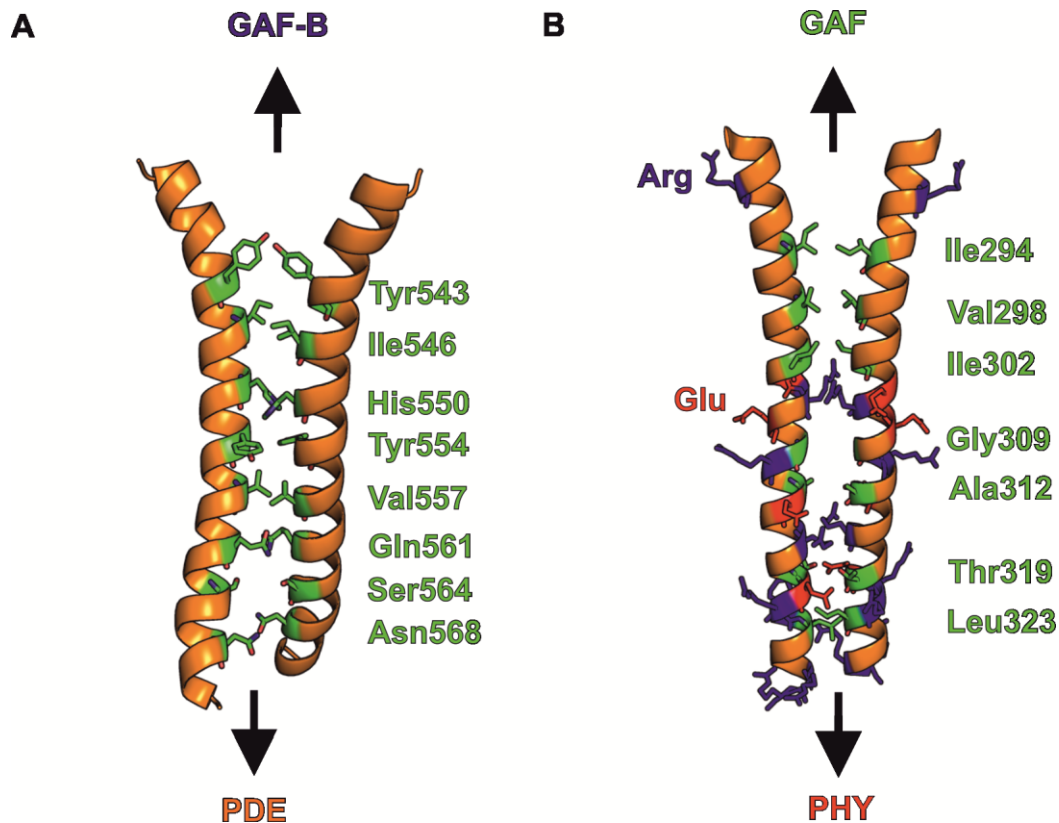


Abbildung 44. Helikale dimere Grenzflächen in *HsPDE2A* und *PaBPhy*. Coiled-Coil-Strukturen werden auch durch polare Wechselwirkungen stabilisiert (Aminosäurereste derselben Helixphase sind grün dargestellt). Coiled-Coils zwischen **A.** *HsPDE2A*-GAF und PDE (PDB-Code: 3IBJ, AS 533-572 [200]) und **B.** *PaBPhy*-GAF und PHY (PDB-Code: 3C2W, AS 285-328 [35]). Glutamat- (rot) und Argininreste (blau) sind hervorgehoben.

Schließlich könnte die Enzymaktivität der Linkervarianten von der Beschaffenheit der Aminosäurereste des Linkers bei gleicher Länge abhängen. LAPD-Varianten wurden ausgehend von initialer LAPD+2 als Deletionsmutanten durch Subtraktion einzelner Aminosäurereste von der *HsPDE2A*-Linkersequenz bzw. als Insertionsmutanten durch Addition einzelner Aminosäurereste aus der *DrBPhy*-WT-Linkersequenz generiert (s. Abbildung 32B&C, Abschnitt 3.3.1). Umgekehrt ist es möglich, Deletions- und Insertionsmutanten von initialer LAPD+2 zu generieren, indem die Aminosäurereste von der *DrBPhy*-Linkersequenz subtrahiert bzw. Aminosäurereste aus der *HsPDE2A*-WT-Linkersequenz addiert werden. Die Inversion von Deletions- und Insertionsfolge

innerhalb des strukturbasierten Linkeralignments könnte bei sich entsprechenden Linkervarianten gleicher Länge unterschiedliche Enzymeigenschaften ergeben. Die invertierten LAPD-Insertionsvarianten würden aus Resten des strukturell nachgewiesenen PDE-Coiled-Coils bestehen und könnten eine zu IlaC oder YF1 analoge Periodizität der Enzymaktivität ergeben. Bei den invertierten LAPD-Deletionsvarianten würde der strukturell nicht gelöste DrBPhy-PHY-Linker sukzessive subtrahiert, und das PDE-Coiled-Coil könnte ebenfalls konserviert werden. Eine alternative Erzeugung von Linkervarianten gleicher Länge besteht in einer Verschiebung des Überkreuzungspunktes im strukturbasierten Linkeralignment (Abbildung 45). Ähnlich hatten die YF1-Varianten YF2-YF4 bei gleicher Linkerlänge eine unterschiedliche Beschaffenheit der Aminosäurereste (Abbildung 45, oben); dabei unterschied sich der Überkreuzungspunkt im Alignment von YtvA und FixL innerhalb der α -Helix sukzessive. YF1 und YF2 waren lichtreprimierte HKs vergleichbarer Aktivität, YF3 war konstitutiv inaktiv und YF4 um eine Größenordnung in der HK-Aktivität reduziert [137]. Ein analoger Effekt müsste bei LAPD überprüft werden, eine durchgängige Helix vorausgesetzt (Abbildung 45, unten). In diesem Zusammenhang wäre es ebenso denkbar, mit einer inversen LAPD(0)-Fusion aus HsPDE2A-GAF-Tandem und BPhy-HK eine cGMP-regulierte Histidinkinase zu generieren.

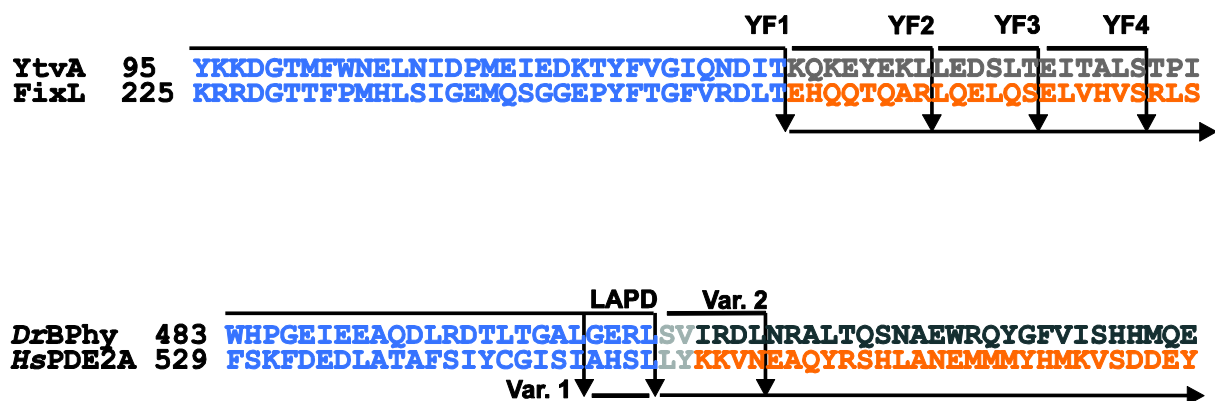


Abbildung 45. Strukturbasierte Linkeralignments zur Konstruktion von YF1 und LAPD. Oben: YF1 besteht aus der N-terminalen LOV-Domäne von YtvA und der C-terminalen katalytischen Domäne von FixL (s. Abschnitt 1.4) [137], die über einen helikalen Linker nach dargestellter Fusionsvorschrift (schwarze Pfeile) verbunden sind. Es wurden Linkervarianten von YF1 mit gleicher Zahl von Aminosäureresten generiert (YF2-4), indem diese von der N-terminalen FixL-Linkersequenz deletiert und gleichzeitig aus der C-terminalen YtvA-WT-Linkersequenz insertiert wurden (schwarze Pfeile). Unten: Ähnlich YF1 könnten analoge Linkervarianten anderer Beschaffenheit konstruiert werden (rechter vertikaler Pfeil; Variante 2). Dabei könnte das Muster aus C-terminaler Insertion und N-terminaler Deletion zusätzlich invertiert werden (linker vertikaler Pfeil; Variante 1). Die Deletion der hellgrauen Aminosäurereste führte von LAPD+2 zu LAPD.

4.1.3 Konstruktion von bestimmten Signalrezeptoren

Neben LAPD existieren mit Cph8 [152], BphS1 [151] (s.u.) und den IlaCs [244] synthetische (cyano)bakterielle Phytochrome, die als funktionale Chimären aus rationaler Konstruktion hervorgegangen sind. Während die Fusion bei Cph8 und BphS1 primär über sequenzdefinierte Domänengrenzen der parentalen Enzyme geleitet wurde, wurden IlaCs [244] und LAPD anhand von struktureller Information entworfen.

LAPD im Vergleich mit BphS1

BphS1 ist eine rotlichtaktivierte Diguanylylzyklase. Sie besteht N-terminal aus dem PCD-Modul des kanonischen *Rhodobacter sphaeroides* Bakteriophytochroms (RsBphG1-WT) und C-terminal aus der katalytischen Domäne (GGDEF; \triangle AS-Sequenzmotiv) der GAF-gekoppelten Diguanylylzyklase Slr1143 aus *Synechocystis* sp. Anders als die Histidinkinase DrBPhy-WT ist das parentale RsBphG1-WT ebenfalls eine lichtaktivierte Diguanylylzyklase (33% Sequenzidentität auf Ebene der Aminosäurereste der GGDEF-Domänen) [151]. Die Größenordnung der spezifischen Aktivität der c-di-GMP-Synthese von Slr1143 sowie der Faktor ~ 11 der Photoaktivierung von RsBphG1-WT wurden in BphS1 konserviert. Der Austausch von homologen GGDEF-Effektoren am selben PCD-Modul bedingte somit die quantitative Konservierung der parentalen Eigenschaften. Im Gegensatz dazu wurden bei LAPD zwei Enzyme unterschiedlicher Klassen, Transferasen (Histidinkinase) und Hydrolasen (PDE), funktional ausgetauscht.

LAPD im Vergleich mit IlaCs

Die Reduktion der parentalen Regulationsfaktoren und spezifischen Aktivitäten der bereits erwähnten BPhy-Zyklase IlaC der ersten Generation (rationaler Entwurf; vgl. Abschnitt 4.1.1) ist in der Konstruktion der Chimäre sowie in Struktur und Mechanismus der Vorläuferenzyme begründet. Verschiedene Gründe für die Störung der Adenylylzyklase IlaC bzw. für die Konservierung der Phosphodiesterase LAPD sind denkbar, die im Folgenden erörtert werden.

Konstruktion von LAPD und IlaCs.

Zum einen war anders als bei der LAPD-Konstruktion ohne gelöste RsBphG1-PCD und CyaB1-Zyklase-Strukturen eine strukturelle Überlagerung der IlaC-Vorläuferrezeptoren nicht möglich. Stattdessen wurden Homologiemodelle des RsBphG1-PCD-Moduls und der CyaB1-Adenylylzyklase generiert, und anhand von

molekularen Abständen (Abbildung 46) wurde die Zahl von möglichen Sensor-Effektor-Kombinationen eingegrenzt. Hier zeigt sich eine Diskrepanz der Abstände von C- und N-Termini der Dimerpartner an den Fusionsstellen zwischen Sensor- bzw. Effektor-Modul. Der geschätzte Abstand der C-terminalen Helizes im Homodimer des BphG1-Sensor-Moduls betrug 11-22 Å (Abbildung 46B), derjenige der N-terminalen β -Faltblätter des CyaB1-AZ-Effektors ~ 40 Å [244] (Abbildung 46A). Die strukturelle Abweichung von mind. ~ 20 Å könnte die Störung der Enzymeigenschaften der IlaCs begründen. Im Gegensatz dazu ist die Abweichung der molekularen Abstände von C- und N-Termini des Sensor- bzw. Effektor-Moduls an der Fusionsstelle im strukturellen Alignment der LAPD-Vorläuferenzyme vernachlässigbar gering. Der Vergleich der Strukturdaten bzw. -modelle der Vorläuferenzyme zeigt für LAPD eine bessere strukturelle Kompatibilität als für IlaCs (vgl. Abschnitt 3.1.1, Abbildung 19 & Abbildung 20 sowie Abschnitt 4.1.2, Abbildung 42).

Zum anderen zeigten die Homologiemodelle der IlaC-Vorläuferenzyme im Gegensatz zur LAPD-Konstruktion strukturelle Abweichungen voneinander: a) waren die Linker in IlaC zwischen Sensor- und Effektor-Modulen strukturell heterolog (α -Helizes für PCD-C-Terminus und β -Faltblatt für AZ-N-Terminus [244]; s. Abbildung 46). Anders waren der PDE-N-Terminus und vermutlich der PCD-C-Terminus der LAPD-Vorläuferenzyme beide jeweils α -Helizes. b) war der Austausch der sensorischen Domänen-Architektur bei den IlaC-Vorläuferenzymen nicht homolog: ein CyaB1-GAF-GAF-PAS-PAS- gegen ein BPhy-PAS-GAF-PHY-Tandem. Hingegen war der Austausch von PDE2A-GAF-A und BPhy-GAF sowie von PDE2A-GAF-B und BPhy-PHY strukturell homolog (Abbildung 20A).

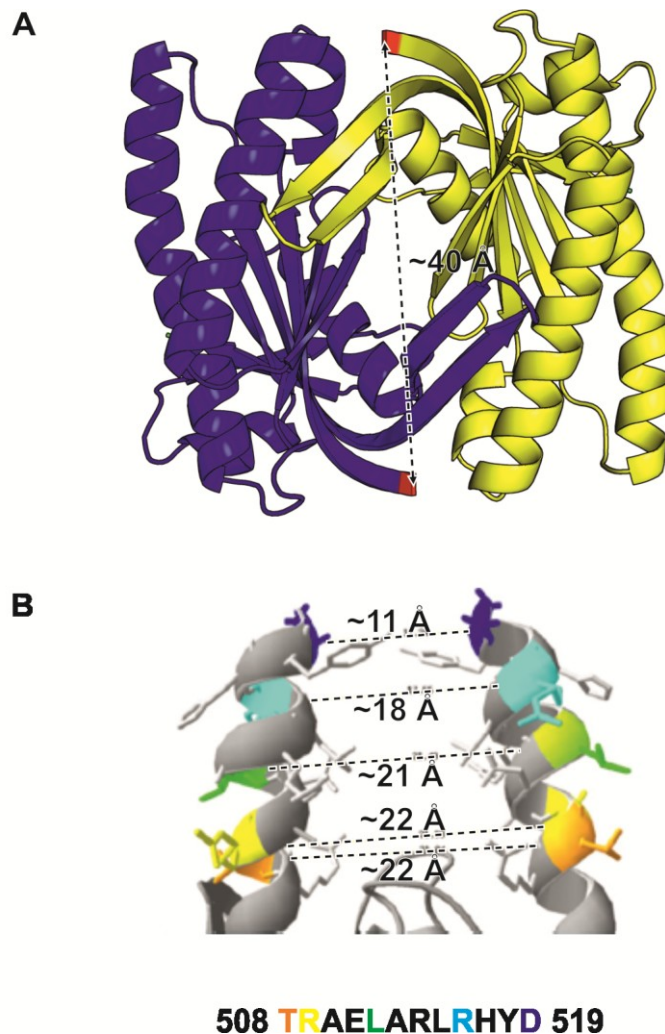


Abbildung 46. Homologiemodelle von *Nostoc punctiforme* (\triangleq *Anabaena sp.*) CyaB1 und *Rhodobacter sphaeroides* BphG1 für die Konstruktion von IlaCs [244]. **A.** Homologiemodell von *NpCyaB1* basierend auf der Struktur von *P. aeruginosa* Adenylylzyklase CyaB (PDB-Code: 3R5G [256]) als Homodimer. Der Abstand (gepunktete Linie) der N-Termini (rot) der beiden Untereinheiten (blau und gelb) beträgt ~40 Å. **B.** C-terminale Helizes des Homologiemodells *RsBphG1* als Homodimer aus [244]. Das Homologiemodell basiert auf den Strukturen von *PaBPhy*-PCD (PDB-CODE:3C2W [35]) sowie von *R. palustris* BPhy (Rpa1_1726) (PDB-CODE:4GW9 [60]). Interhelikale Abstände (gepunktete Linien) sind in Angström (Å) angegeben. Aminosäurereste derselben Helixphase sind farbig markiert. Abbildung 46B ist aus [244] verändert.

Struktur und Mechanismus von LAPD und IlaCs.

Neben konstruktionsbedingten Gründen sind mögliche Ursachen für die Störung der Adenylylzyklase IlaC bzw. für die Konservierung der Phosphodiesterase LAPD in den Eigenschaften der Sensor- und Effektor-Module an sich zu suchen.

Wie die LAPD-Vorläuferenzyme liegen das Bakteriophytochrom *RsBphG1* [244] und die Adenylylzyklase *N. punctiforme* CyaB1 [257] vermutlich als Homodimer vor. Die katalytischen Domänen von CyaB1 [258] und *HsPDE2A* [188] zeigten jeweils isoliert

ohne Sensor-Modul enzymatische Aktivität. Allerdings unterscheiden sich die Vorläufereffektoren AZ und PDE im mutmaßlichen Mechanismus der Enzymregulation. Der IlaC-Vorläufer CyaB1 bildet als mikrobielle Klasse-IIIb-Zyklase das aktive Zentrum über die Dimer-Grenzfläche aus, wobei spezifische Aminosäurereste der jeweils anderen Untereinheit beteiligt sind [17]. Die homologe CyaB-AZ-Domäne aus *P. aeruginosa* (41% Sequenzidentität auf Ebene der Aminosäurereste mit *N. punctiforme* CyaB1-AZ-Domäne) zeigte eine homodimere Struktur [256]; das Homologiemodell zur IlaC-Konstruktion basierte auf dieser Struktur [244]. Dagegen erlauben gelöste PDE-Strukturen den Schluss, dass jede einzelne PDE-Domäne im Homodimer autonom aktiv ist [165,167], vgl. *HsPDE2A* [200] – vermutlich also auch in LAPD (vgl. Abbildung 15C, Abschnitt 1.5.9 und Abschnitt 4.1.2, Abbildung 41). Lichtaktivierte IlaCs der ersten Generation bildeten die katalytische Grenzfläche der AZ mit einer Effizienz von ~0,3% aus (bezüglich der spezifischen Aktivität des Vorläuferenzym CyaB1-WT). Im Vergleich dazu rekonstituierte aktivierte Holo-LAPD, dem enzymatischen Modell nach, durch lichtinduzierte Monomerisierung der PDE-Domänen das aktive Zentrum zu ~100% (bezüglich der spezifischen Aktivität); im Vergleich zum Vorläuferenzym *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) war die spezifische Aktivität von LAPD sogar leicht höher.

Der Dynamikbereich der Enzymregulation betrug bei LAPD ~100% und bei IlaCs ~8% von den WT-Regulationsfaktoren. Auch hier liefert die gute Übereinstimmung der molekularen Abstände eine mögliche Erklärung für die vollständige Konservierung des *HsPDE2A*-Regulationsfaktors in LAPD (s. Abbildung 42, Abschnitt 4.1.2): Die Zentren der GAF-B-Partnerdomänen ohne cGMP (Grundzustand) in der homodimeren *HsPDE2A*-WT-Struktur ((GAF)₂-PDE-Tandem; PDB-Code: 3IBJ) sind ~38 Å voneinander entfernt, die Zentren der GAF-B-Domänen mit cGMP (Signalzustand) der Symmetriepartner des *MmPDE2A*-WT-GAF-Tandems (PDB-Code: 1MC0) ~62 Å (bezogen auf das zentrale Cα-Atom des in *HsPDE2A*-WT und *MmPDE2A*-WT konservierten A518 bzw. A494 im GAF-B-β6-Faltblatt). Der Unterschied von ~24 Å zwischen Grund- und Signalzustand von PDE2A-WT steht in guter Übereinstimmung mit der Änderung von ~19 Å zwischen PHY-Domänen der dunkeladaptierten und belichteten *DrBPhy*-PCD-Struktur (PDB ID: 4O0P bzw. 4O01; bezogen auf das zentrale Cα-Atom L438 in der PHY-Domäne). Vorbehaltlich der strukturellen Unterschiede zwischen trunkiertem *MmPDE2A*-GAF-A—GAF-B-Tandem (1MC0) und dem

vollständigen GAF-PDE-Tandem von *HsPDE2A* (3IBJ) ist folgende Erklärung denkbar: Eine quantitativ ähnliche Molekularbewegung, die in den isolierten sensorischen Tandems aus einer Y-förmigen Öffnung besteht, könnte in *HsPDE2A*-WT und LAPD in eine ähnliche Konformationsänderung übersetzt werden, die in einer quantitativ ähnlichen PDE-Aktivierung resultiert.

Allgemein haben die GAF-basierten chemosensorischen Module im LAPD-Vorläufer PDE2A-WT und im IlaC-Vorläufer CyaB1-WT folgende strukturelle Funktionen [17]: erstens Stabilisierung des Homodimers über ihre Dimerisierungsgrenzfläche, zweitens Ausrichtung der Effektordomänen adäquat und funktional zueinander, drittens Übertragung der Konformationsänderung nach cNMP-Bindung auf die Effektordomäne. Diese Funktionen wurden von *DrBPhy*-PCD in Kopplung mit PDE2A adäquat (= LAPD), von *RsBPhy*-PCD in Kopplung mit CyaB1-AZ bedingt ersetzt (= IlaCs). Eine stark vom WT-Effektor abweichende dimere Molekulargeometrie der IlaC-Chimäre könnte die Effizienzminderung der Katalyse und Regulation bedingen.

4.1.4 Fazit: Signaltransduktionsmechanismus von LAPD und abgeleitete Konstruktionsregeln

Ein enzymatisches Modell zur LAPD-Aktivierung

Als Proteine kommen enzymatische Effektoren in Signalrezeptoren, wie z.B. die PDE-Domänen in *HsPDE2A*-WT, dem MWC-Modell (Monod, Wyman, Changeux) nach in einem inaktiven und aktiven Zustand vor [17]. Den inaktiven und aktiven Proteinmolekülen wird strukturell ein gespannter T (*tense*)- bzw. ein entspannter R (*relaxed*)-Zustand zugeordnet [259]. Die enzymatischen Effektoren liegen in Photorezeptoren in einem Gleichgewicht dieser beiden Zustände vor. Die Lage des Gleichgewichts wird durch die lichtabhängige Konformation des Sensormoduls bestimmt [15]. Der Übergang von T nach R wird in homodimeren Signalrezeptoren vermutlich durch signalinduzierte Konformationsänderungen der Quartärstruktur bewirkt. Bei *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) wird cGMP-abhängig durch Umordnung der Dimerisierungsfläche des sensorischen GAF-Moduls vermutlich die Ausrichtung der katalytischen Effektoren bestimmt, die daraufhin den aktiven Zustand erreichen [17,200]. Die strukturelle Umordnung des PDE-Effektormoduls von T nach R innerhalb des Gleichgewichts wird in LAPD vermutlich von der lichtabhängigen Neuordnung des PCD-Sensormoduls vermittelt [95,243] (Abbildung 47).

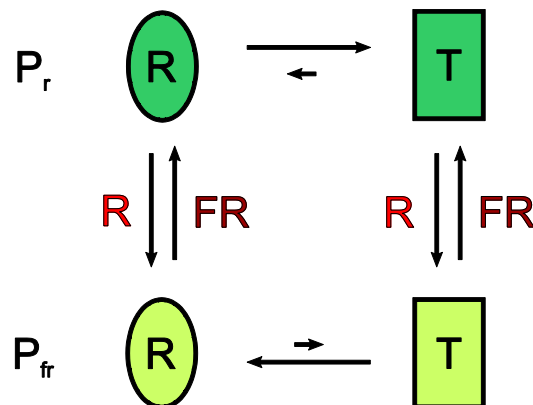


Abbildung 47. Modell zur LAPD-Aktivierung nach Monod, Wyman & Changeux (MWC-Modell) [259] und Möglich & Moffat [15]. Als ein Signalrezeptor könnte LAPD in einem Gleichgewicht zwischen einem biologisch weniger aktiven Zustand T (*tense*, gespannt) und einem aktiveren Zustand R (*relaxed*, entspannt) liegen. Das Lichtsignal R oder FR ändert die Stabilität von T bzw. R . Daher wird die Gleichgewichtskonstante zwischen T und R verschoben und die Enzymaktivität signalabhängig moduliert. Dabei kann jedem Gleichgewicht eine bestimmte P_r/P_{fr} -Ratio zugeordnet werden. Im Fall von dunkeladaptierter LAPD ist die Gleichgewichtskonstante $[T]/[R]$ größer als bei LAPD nach einem R/FR -Zyklus bei gleicher P_r/P_{fr} -Ratio.

Aufgrund des strukturbasierten Linkeralignments wurde initial das Konstrukt LAPD+2 favorisiert, das aber durch eine basale konstitutive PDE-Aktivität charakterisiert war. Dem MWC-Modell nach herrschte in diesem Fall unabhängig von der Lichtadaptation, d.h. vom Zustand des Photosensors (P_r/P_{fr}), ein Gleichgewicht vor, in dem LAPD+2 überwiegend im T-Zustand vorlag [15]. Der Großteil der Linkervarianten zeigte ebenfalls eine konstitutive basale PDE-Aktivität. Das legt nahe, dass der T-Zustand geringer Aktivität in den LAPD-Varianten der thermodynamisch begünstigte ist. Untermuert wird diese Schlussfolgerung durch die Aktivität der isolierten katalytischen PDE-Domäne von *HsPDE2A*-WT ohne GAF-Tandem [188]. Die PDE-Domäne war zwar autark katalytisch aktiv, jedoch mit einer ~10-fach geringeren spezifischen Aktivität als das vollständig cGMP-aktivierte Vollängenkonstrukt [200], was in etwa der Basalaktivität von *HsPDE2A*-WT ((GAF)₂-PDE-Tandem) (~2-3-fach geringer) entsprach. LAPD+1 mit konstitutiver intermediärer Aktivität deutet auf eine Verschiebung des T/R-Gleichgewichts in Richtung des PDE-aktiven R-Zustandes unabhängig von der Beleuchtung, d.h. von der Konformation des PCD-Moduls (P_r/P_{fr}). Funktionale lichtregulierte LAPD(0) liegt demzufolge im dunkeladaptierten Zustand überwiegend als thermodynamisch begünstigter inaktiver T-Zustand vor. Lichtabhängige Konformationsänderungen des PCD-Moduls induzieren eine Dimerumordnung der PDE-Domänen, die den R-Zustand im Gleichgewicht begünstigt (Abbildung 47).

Worin die Diskrepanz zwischen dem theoretisch vorhergesagten LAPD+2-Konstrukt und der experimentell realisierten LAPD(0)-Variante begründet ist, bleibt ungeklärt und könnte durch Strukturanalyse der zwei Linkervarianten untersucht werden. Es ist denkbar, dass nur in LAPD(0) die Spannung ($\triangle T$) im thermodynamisch begünstigten Grundzustand ($\triangle P_r$) durch freie Energie in den gelösten Signalzustand ($\triangle P_r/P_{fr}$) hoher Aktivität ($\triangle R$) überführt werden kann [226]. Im Fall von LAPD wird die freie Energie durch Strahlungsenergie von Rotlicht, im Fall von *HsPDE2A*-WT durch Bindungsenergie der cGMP—GAF-B-Bindung geliefert. Die Spannung könnte letztlich, für den Fall einer konservierten, durchgängigen Helix [137], auf einem Helixwinkelunterschied von +154° von LAPD(0) gegenüber LAPD+2 beruhen (eine 360°-Windung der Helix in einem Coiled-Coil zählt 3.5 Aminosäurereste, d.h., 1 Aminosäurerest entspricht einer Drehung um 103°, 2 Aminosäurereste einer Drehung um 206°: $360^\circ - 206^\circ = +154^\circ$) [144] (s. Abbildung 48).

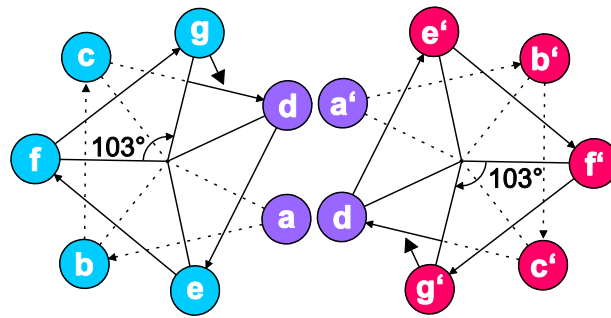


Abbildung 48. Schematische Darstellung eines Coiled-Coils [144]. Dargestellt ist eine Projektion (axiale Sicht auf den C-Terminus) des repetitiven Coiled-Coil-Sequenzmotivs von zwei korrespondierenden rechtsgängigen (Pfeile) α -Helizes: Sieben Aminosäurereste ergeben die Abfolge a b c d e f g (blau) bzw. a' b' c' d' e' f' g' (rot), wobei a und d (blauviolett) bzw. a' und d' (blauviolett) hydrophob sind. Die hydrophobe Wechselwirkung stabilisiert das Coiled-Coil. Aufeinanderfolgende Aminosäurereste sind in einem Coiled-Coil mit einem Winkelunterschied von 103° in den Helizes angeordnet, weswegen eine ganze Helixwindung ($\triangleq 360^\circ$) 3,5 Aminosäureresten entspricht.

Konstruktion von Photorezeptor-Enzymen

LAPD ist der erste Beleg für den bereits zuvor theoretisch geäußerten Vorschlag, Bakteriophytochrom-PCD-Module mit Enzymeffektoren funktional zu fusionieren [15,21]. Funktionale LAPD qualifiziert die angewendete Konstruktionsstrategie für weitere analoge Fusionen. Die Fusionsvorschrift führte zu einer vollständigen Konservierung von Photochemie, spezifischer Enzymaktivität und Regulationsfaktoren der parentalen Signalrezeptoren. Die hier angewendeten Regeln entsprechen zudem denen der lichtreprimierten Histidinkinase YF1 [137], die einerseits die reversible Photoreaktion des LOV-Photosensors aus YtvA, andererseits die Größenordnung der spezifischen Aktivität sowie den enzymatischen Regulationsfaktor von FixL erhalten hatte.

Welche allgemeinen Konstruktionsregeln lassen sich von LAPD ableiten oder untermauern (auf Grundlage des kleinen Datensatzes zu funktionalen Bakteriophytochrom-basierten synthetischen Gruppe-II-Photorezeptoren)?

- Homodimere Signalrezeptoren, die aus einem GAF-basierten Sensor- und einem enzymatischen Effektormodul bestehen und die (vermutlich) über einen Coiled-Coil-Linker gekoppelt sind, lassen sich zu funktionalen Chimären neu kombinieren, wie für die Reporterzyklasen (s. Abschnitt 4.1.1) [199] und LAPD demonstriert.

- Der Austausch von GAF-basierten Sensormodulen ist auch bei unterschiedlicher Domänenarchitektur der Vorläuferenzyme möglich (s. LAPD: GAF-A—GAF-B gegen PAS-GAF-PHY).
- Je größer die Identität von Struktur oder Sequenz im Alignment der Vorläuferenzyme bezüglich der Module und Kopplung ist, desto höher ist die Konservierung der Funktionalität in der Chimäre (s. IlaCs gegenüber LAPD und IlaCs gegenüber BphS1).
- Bakteriophytochrom-PCDs lassen sich funktional mit Säuger-Enzymeffektoren fusionieren (LAPD).
- BPhys und GAF-gekoppelten PDEs liegt vermutlich ein gemeinsamer, konservierter Signaltransduktionsmechanismus zugrunde [17].
- Die Eigenschaften der Vorläufer-Effektorenzyme (v_{\max} , K_M , Regulationsfaktoren) limitieren die Eigenschaften der Chimäre quantitativ (s. LAPD, IlaCs, BphS1 und YF1).
- Homologie des Sensors oder Effektors ist für eine funktionale Chimäre nicht Voraussetzung, eher die Konfiguration der Vorläuferenzyme als (parallele) Homodimere mit Coiled-Coil-Linkern.

4.1.5 Ausblick: Analyse der Signaltransduktion

Weiteres Ziel ist es, eine Röntgenstrukturanalyse von licht- und dunkeladaptierter LAPD durchzuführen. Um eine hohe strukturelle Auflösung zu gewährleisten, wäre die Mutante Y307S in LAPD einzuführen [68]. Die Überlappung von zwei Tyrosin-Symmetriepartnern in Wildtyp-DrBPhy-PAS-GAF-Kristallen wurde dadurch unterbunden [68]. Eine weitere Voraussetzung für Kristallisationsansätze ist die Erhöhung der LAPD-Ausbeute, die bisher verhältnismäßig gering ausfiel ($\sim 1\text{mg/L}$ Expressionskultur). Für die Optimierung von Expression und Reinigung kann die Überexpression im *E.-coli*-Stamm CmpX13 verwendet werden. Bei der Ein-Schritt-Reinigung von LAPD+2 ergab diese zwar eine unreinere Protein-Probe, aber eine höhere Ausbeute. Die Aufzucht von *E. coli* CmpX13-Zellen in einem Batch-Fermenter kann mit höheren Zelldichten der Expressionskultur größere Mengen von LAPD(0) erzielen [260]. Die Fermentation könnte so den Verlust im nötigen zweiten Reinigungsschritt (z.B. Gelfiltrationschromatographie) kompensieren und die Ausbeute allgemein erhöhen. Die vorgeschlagene Quartärstruktur von Holoenzym ist als paralleles Homodimer mit Coiled-Coil-Linker zu verifizieren oder zu falsifizieren und der Mechanismus der intramolekularen Signalübertragung zu ermitteln. Die Kristallstrukturen von P_r- und

P_{fr} -Zustand des DrBPhy-WT-PAS-GAF-PHY-Tandems zeigten die lichtabhängigen Konformationsänderungen des isolierten photosensorischen Moduls des Bakteriophytochroms [250]. Da noch keine Kristallisationsbedingungen für ein natürliches Volllängen-Bakteriophytochrom erzielt wurden, war eine Analyse bislang nur über Kryo-Elektronenmikroskopie (EM) und *Small-angle X-ray scattering* (SAXS) mit Auflösungen von maximal ~ 13 Å bzw. 10-50 Å möglich [95,261]. In Zusammenarbeit mit Jörg Bürger (Mikroskopie-Gruppe (Thorsten Mielke), Max-Planck-Institut für Molekulargenetik, Berlin) wurde eine vorläufige EM-Analyse an dunkeladaptierter LAPD durchgeführt. Mittels sogenannten *negative stain* („negativer Färbung“) wurde gereinigte LAPD mit Uranylacetat-Lösung auf einem Kohlenstoff-beschichteten Tränergitter fixiert und in der Vakuumkammer eines Transmissionselektronenmikroskops analysiert. Trägerbereiche mit reinem Schwermetallsalz Uranylacetat erscheinen dunkel, da die Elektronen durch die Schweratome stark abgelenkt und durch die Objektiv-Apertur ausgeschlossen werden. Bei der Präparation des *negative stain* wird Uranylacetat von Volumina mit Proteinmolekülen ausgeschlossen, weshalb Zonen mit Protein-Uranylacetat-Gemischen die Elektronen schwächer ablenken. Diese werden durch das Mikroskop fokussiert und erscheinen daher als helle Bereiche [262]. Die 28500-fache Vergrößerung zeigt eine homogene Verteilung von LAPD-Molekülen (Abbildung 49A). In der isotropen Verteilung erscheinen einzelne Proteinmoleküle als zylindrische symmetrische Partikel. In deren Form und Abmessungen stimmen sie gut mit der Einzelpartikelanalyse von DrBPhy-WT-Dimeren überein: Die zentrale Molekülachse des DrBPhy-WT-Dimers wurde mit ~ 120 Å bestimmt [95], die eines einzelnen LAPD-Moleküls mit ~ 135 Å (Abbildung 49B). Der Längenunterschied könnte zum einen dadurch bedingt sein, dass das DrBPhy-WT-Modell als Ergebnis der Einzelpartikelanalyse aus einer Vielzahl von Molekülen gemittelt ist, wohingegen die Messung an LAPD auf einem ausgewählten Molekül einer bestimmten Orientierung basiert. Zum anderen unterscheiden sich DrBPhy-WT und LAPD im Molekulargewicht um ~ 20 kDa. Die Länge des zylindrischen LAPD-Moleküls von ~ 135 Å ist unter den obengenannten Bedingungen mit der Länge eines LAPD-Strukturmodells von ~ 150 Å grob vergleichbar (s. Abschnitt 5.1.3, Abbildung 52).

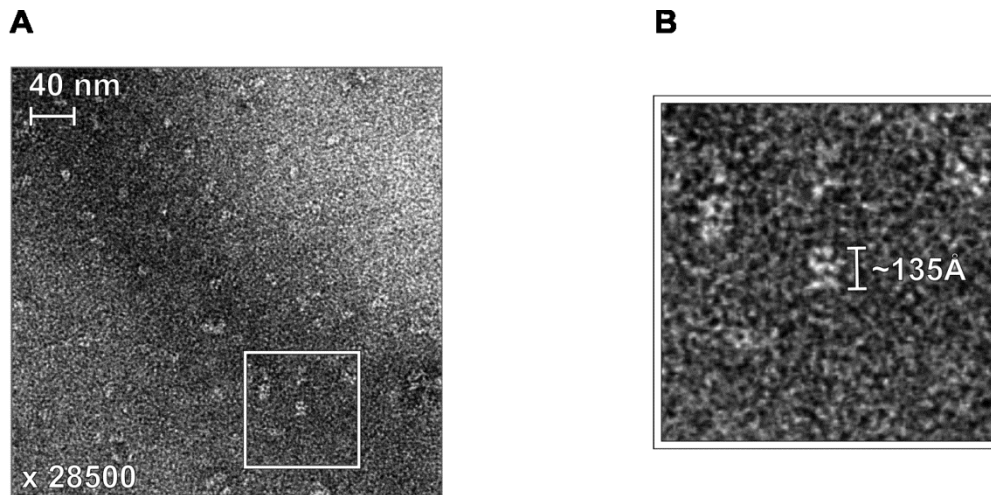


Abbildung 49. Negative-Stain-EM-Aufnahme von LAPD. 3,5 μ l gereinigte 50 nM LAPD-Lösung (20 mM NaCl, 20 mM Tris, 7 mM β -Mercaptoethanol, 20% Glycerin, pH 8,0) wurde auf ein Tränergitter (Holey carbon grids R2/4, Kupfer-Rhenium, Quantifoil) pipettiert, das zuvor im Vakuum-Plasma (0,3 mbar, Plasma Cleaner, Harrick) mit Kohlenstoff beschichtet wurde. Der aufgetragene LAPD-Tropfen wurde mit 3,5 μ l 2%iger Uranylacetat-Lösung versetzt und nach Trocknung in der Vakuumkammer (10^{-6} - 10^{-7} Pa) eines Elektronenmikroskops (CM100, 1k x 1k-Fastscan-CCD-Kamera, Philips) analysiert (TEM-Hochspannung: 100 kV; TEM-Vergößerung: 28500 x; Bild-Pixel-Größe: $0,3800310 \text{ nm pixel}^{-1}$; Kamera-Belichtungszeit: 500 ms; Kamera-Elektronendosis $0,0 \text{ e nm}^{-2}$) **A.** Dunkeladaptierte LAPD-Probe in 28500-facher Vergrößerung. **B.** LAPD-Moleküle in vergrößertem Bildausschnitt (weißer Rahmen). Die Länge von $\sim 135 \text{ Å}$ eines zylindrischen LAPD-Moleküls ist angegeben (vgl. mit der Länge des LAPD-Strukturmodells von $\sim 150 \text{ Å}$; s. Abschnitt 5.1.3, Abbildung 52).

4.2 LAPD als optogenetisches Werkzeug

4.2.1 Eigenschaften von LAPD im zellulären Kontext

LAPD wurde in der PDE-Reporterzelllinie *in vivo* exprimiert, um den Lichtregulationsfaktor des löslichen Enzyms unter zellulären Bedingungen zu testen: in Anwesenheit von kompensierenden endogenen Guanylylzyklasen, cGMP-spezifischen PDEs [167] sowie innerhalb komplexer Signal- und Stoffwechselwege. Wie unter *In-vitro*-Bedingungen wurde LAPD auch in der PDE-Reporterzelle durch Weißlicht aktiviert (vgl. Abschnitt 3.2.2, Abbildung 31 bzw. Abschnitt 3.4.2, Abbildung 39). Der *in vitro* ermittelte Lichtregulationsfaktor ~ 6 von LAPD (bezüglich v_{\max}) wurde in der PDE-Reporterzelle in einen Biolumineszenzunterschied des Faktors ~ 4 übersetzt. Aufgrund der multiplen Prozesse, aus denen die Signalkaskade der PDE-Reporterzelle besteht, ist die Relation von ANP-Konzentration zu Lumineszenz hochgradig nicht-linear. Eine quantitative Interpretation des Regulationsfaktors und der enzymatischen Eigenschaften von LAPD in diesem Zellsystem ist daher nur bedingt möglich. Die 65-80%ige Auslöschung des Lumineszenzsignals in den stabil transfizierten LAPD-Reporterzelllinien unter Belichtung zeigte, dass der intrazelluläre cGMP-Spiegel durch lichtaktivierte LAPD schneller gesenkt wurde als in dunkeladaptierten Zellen (s. Abschnitt 3.4.2, Abbildung 39A). Daher war der Ca^{2+} -Einstrom durch cGMP-geöffnete CNG2A-Kanäle im Licht geringer und die Biolumineszenz niedriger als unter Dunkelbedingungen. Die leichte Erhöhung der halbmaximalen ANP-Effektorkonzentration auf $3,9 \pm 0,1$ nM kann mit der erhöhten PDE-Aktivität im Licht erklärt werden. Der konstante K_M -Wert bei Licht- und Dunkelbedingungen *in vitro* schließt eine Reduktion der Enzymaffinität für cGMP als Grund der EC_{50} -Erhöhung (ANP) aus. Eine Änderung der ANP-Affinität der rezeptorgekoppelten Guanylylzyklase sowie der cGMP-Affinität des CNG2A-Kanals ist unwahrscheinlich. Die lichtabhängige Biolumineszenz-Auslöschung im CHO-System wurde über Titration mit spezifischem PDE2-Inhibitor BAY-60-7550 als LAPD-spezifisch bestimmt (s. Abschnitt 3.4.2, Abbildung 39C). Dabei lag der EC_{50} -Wert $3,0 \pm 0,2$ nM (BAY-60-7550) für belichtete Zellen in derselben Größenordnung wie derjenige für HsPDE2A-WT-exprimierende Reporterzellen von 6 nM [213]. Mit BAY-60-7550 steht nun für *In-vivo*-Systeme ein potenter Inhibitor zur Verfügung, mit dem die Spezifität der entsprechenden LAPD-induzierten Antwort verifiziert werden kann.

Die Phosphodiesterase im zellulären Kontext

Die indirekt über Biolumineszenz gemessene *In-vivo*-Aktivität von LAPD erscheint plausibel, da bereits die Expression von *HsPDE2A3-WT* mit vergleichbaren enzymatischen Konstanten im CHO-Assay Lumineszenzwerte in derselben Größenordnung ergeben hatte [213] (s. Abschnitt 3.4.2, Abbildung 39B&D). Untermuert wird der experimentelle Befund durch Betrachtung der theoretischen *In-vitro*-D/L-Aktivität von LAPD im Kontext zellphysiologischer *Steady-state*-Konzentration von cGMP, deren Umfang 0,1-10 μM beträgt [263]: Belichtete (R) LAPD ist im Vergleich zur natürlichen cGMP-aktivierten *HsPDE2A-WT* ~6-mal so aktiv (bezüglich v_{max}). Die Michaelis-Menten-Gleichung ergibt aber sowohl für *HsPDE2A-WT* als auch für LAPD Anfangsgeschwindigkeiten (v_0) derselben Größenordnung, wenn die physiologischen cGMP-Konzentrationen eingesetzt werden (Tab.7). Die vergleichbare katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) von *HsPDE2A-WT* und LAPD von $\sim 5,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. $\sim 7,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (bezüglich der cGMP-Hydrolyse), mit leicht höherer Effizienz von LAPD, deutet auf die Eignung für optogenetische *In-vivo*-Applikationen innerhalb des endogenen cGMP-Konzentrationsbereichs.

Tabelle 7. Anfangsgeschwindigkeiten bei physiologischen cGMP-Konzentrationen.

	<i>HsPDE2A</i> [*]	LAPD [*] (R)
$K_M / \mu\text{M}$	~80	~340
$V_{\text{max}} / \mu\text{M cGMP (min nM Enzym)}^{-1}$	~2,5	~15,1
$v_0 (10 \mu\text{M}) / \mu\text{M cGMP (min nM Enzym)}^{-1}$	~0,3	~0,4
$v_0 (1 \mu\text{M}) / \mu\text{M cGMP (min nM Enzym)}^{-1}$	~0,03	~0,04
$v_0 (0,1 \mu\text{M}) / \mu\text{M cGMP (min nM Enzym)}^{-1}$	~0,003	~0,004

* cGMP- bzw. rotlichtaktiviert

Die Bakteriophytochrom-Photochemie im zellulären Kontext

Die thermische Rückkehr des metastabilen Signalzustands P_{fr} in den P_r -Grundzustand von LAPD (s. Abbildung 28F, Abschnitt 3.2.1) korrelierte *in vitro* zeitlich mit einer entsprechenden Reduktion der PDE-Aktivität rotlichtadaptierter LAPD im Dunkeln (4 min Dunkeladaptation ergab eine Reduktion der PDE-Aktivität um ~20%; s. Abbildung 31, Abschnitt 3.2.2). Ein Bestrahlungsprotokoll von 30 s Rotlicht und 4 min Dunkelintervall würde daher theoretisch ausreichen, um in einem Modellorganismus noch eine kontinuierliche LAPD-Aktivität von ~90% im zeitlichen Mittel zu gewährleis-

ten. Kurzzeitige Lichtanregung bewirkt somit einen langanhaltenden cNMP-Abbau. *In vivo* ist daher zur LAPD-Aktivierung vermutlich nur gepulstes Rotlicht nötig, um eine vergleichbare Netto-PDE-Aktivität wie unter Dauerlicht zu erzielen. Wegen der relativ langen Dunkelintervalle würden phototoxische und thermische Zellschäden reduziert. Die Langlebigkeit des LAPD-Signalzustands erlaubt wie bei IlaCs die optogenetische Perturbation von Langzeit-Signaltransduktionsprozessen [244]. Zu diesem Zweck wurde die Halbwertszeit des P_{fr} -Signalzustands von IlaC 22 k27 der zweiten Generation durch ortsspezifische Mutagenese des PCD-Moduls erhöht (Y259F; entspricht der homologen retardierenden Photozyklus-Mutation in *Arabidopsis thaliana* Phytochrom PhyB). Die Zeitkonstante des P_{fr} -Zerfalls wurde so von $\tau_{off} = 46 \pm 3$ s auf 197 ± 9 s verlängert. In einem kolorimetrischen Adenylylzyklase-Assay in *E. coli* (s. Abschnitt 4.2.3) zeigte IlaC 22 k27 Y259F mit verlangsamter thermischer Reversion bei gepulstem Licht (30 s Licht; 90 s Dunkelheit) sogar eine signifikant höhere Aktivität (Expression des Reportergens) als der Vorgänger IlaC 22 k27. Die WT-DrBPhy-PCD von LAPD zeigte schon ohne Photozyklus-Mutation eine mindestens 10-fach langsamere Rückkehrkinetik als IlaC 22 k27 Y259F (Tab.4). Als ein Langzeit-Signaltransduktionsprozess könnte beispielsweise die cAMP-abhängige PKA-CREB-Kaskade (*protein kinase A*; *cAMP responsive element-binding protein*) durch Rotlicht kontrolliert werden, die über Genexpression unter anderem an der Langzeit-Gedächtnisbildung beteiligt ist [264] (s. Abschnitt 1.5.1).

cAMP/cGMP-abhängige Kurzzeit-Signaltransduktionsprozesse sind über LAPD aufgrund des langlebigen Signalzustands nur bedingt zu kontrollieren, beispielsweise der Sehprozess über LAPD als Rhodopsin-Ersatz [265]. Die direkt lichtregulierte PDE könnte defekte Aktuatoren der Sehkaskade von Rhodopsin bis PDE6 kurzschließen, d.h. als Retina-Prothese das Rhodopsin-PDE6-Tandem aus degenerierten Sehzellen in anderen intakten Geweben ersetzen (z.B. bei *Retinitis pigmentosa*). Die Perturbation dieser Prozesse bedarf Photozyklen mit kurzlebigen und reversiblen Signalzuständen. Entsprechend müsste bei LAPD einerseits die thermische Reversion im Dunkeln über Mutation oder Austausch der BPhy-PCD um mehrere Größenordnungen beschleunigt werden (s. Abschnitt 4.2.3). Andererseits müsste die katalytische Effizienz der PDE2A-Domäne den PDE6-Konstanten angenähert werden, z.B. durch Mutation der PDE2A-Domäne oder durch direkte Fusion von BPhy-PCD und PDE6.

Im Vergleich zur thermischen Reversion ergab die vollständige photochemische Rekonversion des akkumulierten P_{fr} -Signalzustands in den P_r -Grundzustand durch FR-Licht (5 min mit 850-nm-LED; s. Abbildung 28B, Abschnitt 3.2.1) eine schnellere Reduktion der PDE-Aktivität (s. Abbildung 31, Abschnitt 3.2.2). Eine Konversionsrate dieser Größenordnung ist für die optogenetische Perturbation von Kurzzeit-Signalprozessen nicht geeignet. Da P_r - und P_{fr} -Spektren ein Überlappungsintegral bilden, muss dunkeladaptierte LAPD mit möglichst kurzwelligem Licht bestrahlt werden, damit eine möglichst effiziente $P_r \rightarrow P_{fr}$ -Konversion abläuft. Hingegen muss rotlichtadaptierte LAPD mit möglichst langwelligem Licht beleuchtet werden, so dass die $P_r \rightarrow P_{fr}$ -Umwandlung ineffizient ist (s. Abschnitt 3.2.1). Eine hohe Intensität langwelliges Lichts von schmaler spektraler Bandbreite, wie sie bei einem Infrarot-Laser gegeben ist (z.B. 852 ± 5 nm), könnte ein entsprechender Kompromiss für eine schnelle $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Reversion sein.

Für die Anwendung von LAPD auf Kurzzeit-Signalprozesse ist die nicht vollständige Wiederherstellung der basalen PDE-Aktivität nach einem R/FR-Zyklus trotz vollständiger $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Reversion von Nachteil (noch ~2,6-fache PDE-Aktivität im Vergleich zu einfacher FR-Bestrahlung). Diese intrinsische Irreversibilität der LAPD-Aktivität könnte durch zufällige oder rationale Mutagenese analog zu den IlaCs sowie durch Austausch der BPhy-PCD reduziert werden [244], beispielsweise durch Stabilisierung des P_r -Zustands über Mutagenese der PCD. Der Austausch von Glu188 gegen Leu (Q188L) stabilisiert im Bathyphytochrom *PaBPhy*-WT den P_r -Zustand und verlangsamt die thermische Reversion von P_r in den Grundzustand P_{fr} ~22-fach. Bei LAPD mit kanonischer Phytochrom-PCD ist ein ähnlicher Effekt denkbar [35]. Die *DrBPhy*-WT-PCD wurde systematisch einer Mutationsanalyse unterzogen; einige *DrBPhy*-Einfachmutanten zeigten unter Rotlicht Q-Banden mit sehr schwach ausgeprägter P_{fr} -bedingter Schulter bei 750 nm (*DrBPhy*: Δ N1-20, F203A/H/W, Y176H, Y263H, D207N; alle ausgewählten Mutanten zeigten einen zum Wildtyp vergleichbaren BV-Einbau und eine $P_r \rightarrow P_{fr}$ -Photokonversion) [70]. Allerdings liegen keine kinetischen Daten zur thermischen Reversion vor, auf deren Grundlage man schnell revertierende Photozyklus-Mutanten auswählen könnte.

Die unvollständige Reversion im Dunkeln nach Anregung mit Rotlicht und die ineffiziente lichtgetriebene Reversion durch FR-Licht machen die *DrBPhy*-PCD-basierte LAPD zu einem synthetischen Photorezeptor von großer Lichtempfindlichkeit (s. Abschnitt 4.1.1).

Der Chromophor Biliverdin im zellulären Kontext

Die intrazelluläre Verfügbarkeit von Chromophor und die Rekonstitution des heterolog exprimierten Holo-Photorezeptors sind für den Erfolg optogenetischer Anwendungen entscheidend [21]. Eine extrazelluläre Zugabe von Biliverdin zum CHO-Zellkulturmedium erhöhte weder die PDE-Aktivität noch den Biolumineszenz-Unterschied zwischen licht- und dunkeladaptierten LAPD-Reporterzelllinien (s. Abschnitt 3.4.2). Die endogene BV-Konzentration von CHO-Zellen reichte demnach aus, um die maximale durch LAPD vermittelte Lichtantwort zu erzielen. Die Reduktion von cAMP-Spiegeln durch LAPD in Zebrafischembryonen ohne zusätzlichen Chromophorüberschuss untermauert diesen Befund [226] (s. Abbildung 50, Abschnitt 4.2.2). Im Gegensatz dazu wurde das Fluoreszenzsignal des *DrBPhy*-basierten IFP (*infrared-fluorescent protein*) in HEK-Zellkultur und in Mäusen (Leber) durch exogenes bzw. injiziertes BV signifikant verstärkt [157]. Die endogene Konzentration von BV lag für diese Anwendung und in diesen Zellen somit unterhalb der Sättigung des Fluoreszenzsignals. Grund dafür war der unvollständige BV-Einbau durch die fluoreszierende *DrBPhy*-CBD-D207H-Mutante [70]. Analog zu LAPD benötigte das *RpBphP2*-PAS-GAF-basierte iRFP (*infra-red fluorescent protein*) keine zusätzliche BV-Addition, um in HeLa-Zellkultur das maximale Fluoreszenzsignal zu generieren (in der Mäuseleber wurde dagegen auch bei iRFP die Fluoreszenz durch BV-Injektion *in vivo* noch ~7-fach gesteigert) [241]. iRFP hatte eine 12-fach höhere BV-Bindungsaffinität als der Vorläufer IFP [157]; die höhere BV-Affinität war durch die D202T-Mutation bedingt, die in *DrBPhy* einen vollständigen BV-Einbau gezeigt hatte (entspricht in *DrBPhy* D207T) [70]. Das heißt, dass nicht nur die Bioverfügbarkeit des Chromophors, sondern auch die Effizienz der Inkorporation, d.h. der GAF-Lyaseaktivität, für die Rekonstitution entscheidend ist [241]. Die isolierte vollständige *DrBPhy*-WT-PCD und das Vollängen-*DrBPhy*-WT mit Histidinkinase-Modul inkorporierten nämlich BV gleichermaßen stark [28,68,110]. Der Einbau von BV in LAPD erfolgte während Expression in *E. coli* und Reinigung *in vitro* zu ~100% über Anreicherung (s. Abschnitt 3.2.1 und Abbildung 33B, Abschnitt 0). Die Expression von LAPD sowohl in CHO-Zellen als auch in Zebrafischen deutet nicht auf einen defizienten Einbau, da LAPD in diesen Systemen einen lichtabhängigen Effekt bewirkte (s. Abbildung 39, Abschnitt 3.4.2 & Abbildung 50, Abschnitt 4.2.2). Wegen der niedrigen Apoproteinaktivität wäre ein nicht-quantitativer BV-Einbau bis zu einem be-

stimmt Grad für die *In-vivo*-Anwendung vermutlich unerheblich (s. Abbildung 33C, Abschnitt 0). Inwieweit LAPD im Tiermodell einer zusätzlichen BV-Injektion zur maximalen Lichtantwort bedarf, bleibt durch die Anwendung zu klären. Die BV-Konzentration könnte in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben variieren [21]. Allein die Transfektion mit LAPD-DNA ohne die Zugabe von Chromophor genügte in den getesteten Expressionssystemen (Oozyten, CHO), um *in vivo* eine lichtaktivierte PDE-Aktivität zu erzeugen. Somit ist eine rein optogenetische Kodierung in diesen Zellen und Geweben ohne Chromophoraddition möglich.

4.2.2 Anwendung von LAPD *in vivo*

Die Erhöhung der cGMP- und cAMP-Hydrolyse durch belichtete LAPD in CHO-Zellen bzw. Oozyten hat die optogenetisch kontrollierte Degradation von *Second-messenger*-Spiegeln ermöglicht.

In Zebrafischlarven wurde LAPD exprimiert und der cAMP-Level des ganzen Tiers unter verschiedenen Lichtbedingungen gemessen [226]. Nach Injektion von LAPD-mRNA wurden die Embryonen zunächst zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels mit Forskolin inkubiert (s. Abbildung 50A). Unter R-Bestrahlung war in LAPD-exprimierenden Fischlarven der cAMP-Spiegel im Vergleich zu dem in untransfizierten Larven um ~40% erniedrigt (s. Abbildung 50B, links). Im Gegensatz dazu war bei FR-Belichtung der cAMP-Level im Vergleich zu dem in Kontrolltieren ohne LAPD-mRNA-Injektion unverändert (s. Abbildung 50B, rechts). Das Experiment belegt die Funktionalität von cAMP/cGMP-spezifischer LAPD in einem vertebraten Modellorganismus.

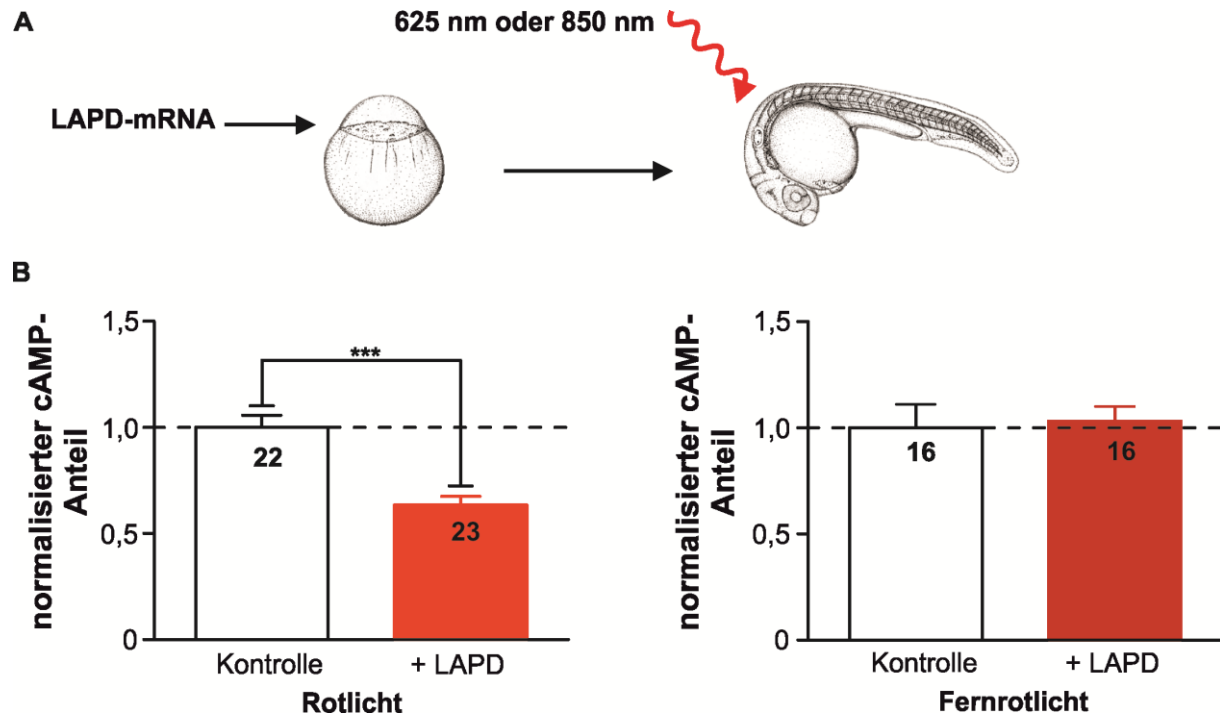


Abbildung 50. LAPD-Expression in Zebrafischlarven [226]. **A.** Zebrafischembryonen im Ein-Zell-Stadium wurde LAPD-mRNA injiziert. Einen Tag nach Befruchtung wurden die Embryonen mit Forskolin inkubiert, um die intrazelluläre cAMP-Konzentration zu erhöhen, und gleichzeitig 5 h mit R- oder FR-Licht bestrahlt. Anschließend wurden ganze Larven homogenisiert und die cAMP-Konzentration mittels ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt. **B.** Unter R-Licht waren die cAMP-Level im Vergleich zu denen in nicht-transfizierten Kontrolltieren um ~40% erniedrigt (Zweistichproben-t-Test, $P < 10^{-5}$) (links). Im Gegensatz dazu unterschieden sich unter FR-Licht die cAMP-Spiegel von Embryonen mit LAPD-Injektion und Kontrolllarven nicht ($P = 0,81$) (rechts). Die Messungen wurden von Chen-Min Yeh (Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg) durchgeführt.

Mehrere cAMP-abhängige Prozesse wurden bereits mit der blaulichtaktivierten Adenylzyklase bPAC optogenetisch analysiert: Infektionszyklus von *Toxoplasmodium gondii* [130], Stress-Antwort in Zebrafischen [131], Verhalten von *Drosophila* [127] (s. Abschnitt 1.3) und Fertilität von Mäusespermien [266]. Auch der Einsatz der komplementären LAPD ist für die Untersuchung dieser Signalprozesse denkbar. Allerdings ist bei einer optogenetischen Kombination aus bPAC und LAPD die Überlappung der Aktionsspektren zu berücksichtigen, die eine gleichzeitige Aktivierung von LAPD durch Anregung bei $\lambda \sim 400$ nm (Soret-Absorption) und von bPAC durch Anregung bei $\lambda \sim 450$ nm ($S_0 \rightarrow S_1$ -Übergang von FAD) ergibt. In einer blaulichtadaptierten Oozyte synthetisierte und degradierte bPAC bzw. LAPD cAMP-Spiegel gleichzeitig. Unter diesen Bedingungen war lediglich eine Netto-Zyklaseaktivität zu messen (Abbildung 35). Veränderte optische Einstellungen könnten zur Realisierung des bPAC-LAPD-Tandems führen: Anregung von bPAC an der

langwelligen Absorptionsflanke des $S_0 \rightarrow S_1$ -Übergangs mit z.B. ~ 500 -nm-Licht hoher Intensität und enger spektraler Bandbreite unter gleichzeitiger Bestrahlung mit ebenfalls intensivem und definiertem FR-Licht. In dem resultierenden photostationären Gleichgewicht würde LAPD vorwiegend im P_r -Zustand vorliegen, wo der basal aktive T-Zustand überwiegt. Die Aktivierung von LAPD würde durch Dimmung des FR-Lichtes ausgelöst und kontrolliert werden. Eine denkbare Anwendung des bPAC-LAPD-Tandems wäre eine optogenetische Fixierung einer gewünschten *Steady-state*-Konzentration von cAMP durch definierte Expressions- wie Belichtungsbedingungen („cAMP-Klemme“).

LAPD könnte in bestimmten Neuronen exprimiert und Biliverdin hinreichend inkorporiert werden. Die Adenylylzyklase *IlaC22 k27* wurde in cholinergen Neuronen von *C. elegans* ohne Zusatz von exogenem Biliverdin funktional exprimiert [244]. *IlaC*-exprimierende Nematoden zeigten unter Belichtung aufgrund der erhöhten AZ-Aktivität eine signifikant moderate Erhöhung der motorischen Aktivität im Vergleich zu untransfizierten Kontrolltieren [244].

LAPD könnte für die Tiefenstimulation von Tiergeweben besonders geeignet sein, da die Absorptionsmaxima von *DrBPhy*-WT-PCD innerhalb des Transparenzfensters von Säugergewebe liegen (650-900 nm) [145]. Die daraus folgenden Vorteile von LAPD sind die große Eindringtiefe von Rotlicht in tierisches Gewebe, die geringe Phototoxizität im langwelligen Spektralbereich sowie die geringe Überschneidung mit Absorptionsquerschnitten anderer Photorezeptoren oder Fluoreszenzreporter im nahen Infrarotbereich [21].

4.2.3 Eine Bakteriophytochrom-basierte Optogenetik

Bakteriophytochrome verglichen mit cyanobakteriellen und pflanzlichen Phytochromen

Zusammen mit den lichtabhängigen Adenylylzyklasen IlaCs [244] hat LAPD die Möglichkeit einer Bakteriophytochrom-basierten Optogenetik in Vertebraten eröffnet. Dagegen bildete bisher die pflanzliche PhyB-PCD die Grundlage für synthetische Phytochrome, die als Gruppe-I-Photorezeptoren über Assoziation/Dissoziation von PhyB-PIF reguliert werden [140]. Im Gegensatz zum PhyB-PIF-System wurde das bisher einzige synthetische (cyano)bakterielle Phytochrom Cph8 in prokaryotischem Kontext verwendet [267].

Synthetische Bakteriophytochrome wie LAPD und IlaCs haben den entscheidenden Vorteil, dass sie Biliverdin als Chromophor inkorporieren [226,244]. Im Gegensatz zu diesen tragen cyanobakterielle und pflanzliche Phytochrome PΦB bzw. PCB. In pflanzlichen Phytochromen ist PΦB zwar funktional durch PCB aus cyanobakterieller Quelle ersetzt worden (vgl. Abschnitt 1.4.2). Beide linearen Tetrapyrrole werden jedoch in Vertebraten nicht synthetisiert. Daher muss exogenes PCB über das Expressionsmedium hinzugefügt werden, was auch für Säugerzellen beschrieben wurde [147,148,268]. Ein anderer Weg führt über heterologe Koexpression von biosynthetischen Enzymen, die PCB aus BV umwandeln. Die heterologe *In-vivo*-Rekonstitution wurde für Bakterien und CHO-Säugerzellen etabliert [152,160,269]. Im Gegensatz zu PCB kommt BV im Häm-Katabolismus von eukaryotischen Zellen vor und musste für die optogenetische Anwendung in mehreren Studien nicht zugeführt werden [21]. Ebenfalls waren IlaCs aufgrund der Bioverfügbarkeit von BV in Säugerzellen [21] ohne zusätzliche Chromophorzugabe in cholinergen Neuronen von *C. elegans* funktional [244].

Verbesserte LAPD-Derivate

Auf Grundlage von LAPD könnten Derivate mit anderen spektralen, photochemischen und enzymatischen Eigenschaften generiert werden. Zum einen würde die Analyse von (nicht-)funktionalen LAPD-Derivaten ein Verständnis der Signaltransduktion zwischen Sensor- und Effektormodul ermöglichen. Zum anderen würde dadurch LAPD auf spezifische optogenetische Anwendungen zugeschnitten werden. Solche Modifikationen können a) über zufällige oder ortsspezifische Mutagenese in der PCD- oder PDE-Domäne eingeführt werden. Dabei entstehen die

Mutationen durch die PCR-basierte Mutagenese zufällig bzw. sind aus vorhergehenden Studien der parentalen Proteine oder Homologe bereits bekannt. Es können b) gemäß der LAPD-Konstruktionsvorschrift analoge Konstrukte erzeugt werden, die alternative PCD- oder PDE-Module anderer Vorläuferproteine mit unterschiedlichen Eigenschaften tragen, wie nachfolgend beschrieben.

Änderung des PCD-Moduls.

Eine spektrale Verschiebung der Aktivitätsmaxima von LAPD durch ortsspezifische Mutagenese zur tieferen Rotverschiebung ist unwahrscheinlich, denn die Absorptionsmaxima der *DrBPhy*-PCD wurden durch Mutation nur geringfügig innerhalb von ~10 nm verändert [70]. Andererseits kann die thermische $P_{fr} \rightarrow P_r$ -Reversion durch Einzelmutationen in der PCD beschleunigt und somit die Lebenszeit der gekoppelten Effektoraktivität einer biologischen Fragestellung angepasst werden (s. Abschnitt 4.2.1). Zu diesem Zweck wäre der Einbau der Mutation H290T in die LAPD-GAF-Domäne denkbar (vgl. Abschnitt 1.2.10). H290T kommt in *Stigmatella aurantiaca* BPhy1 auf homologer Position als T289 natürlich vor. SaBPhy1 zeigt innerhalb der kanonischen Bakteriophytochrome eine ungewöhnlich schwache P_{fr} -Bildung und eine schnelle thermische Reversion [245]. Die Einführung von H290T in *DrBPhy*-WT zeigte einen ähnlichen Befund [70]. Eine Mutationsstudie zu Photochemie und Signaltransduktion von pflanzlichem PhyB könnte durch homologe Mutationen die Weiterentwicklung von LAPD vorantreiben [270].

Die zweite Modifikationsstrategie könnte beispielsweise zu einer spektralen Variante von LAPD durch Austausch des gesamten PCD-Moduls führen: Das PCD-Modul von *Rhodopseudomonas palustris* BPhy3 mit P_r/P_{nr} -Photozyklus (700/650 nm) [101] könnte eine blauverschobene LAPD ergeben. Eine photochemische Variante könnte durch Verwendung der PCD von *Bradyrhizobium* s. BPhy3 ORS278 erzeugt werden [83]. Die thermische Reversion $P_r \rightarrow P_o$ verläuft anders als bei vielen Bakteriophytochromen nicht in der Größenordnung von Minuten bis Tagen, sondern innerhalb weniger Sekunden. Das hätte den Vorteil einer höheren Zeitauflösung der optogenetischen Aktivierung. Allerdings verwendet BPhy3 ORS278 den für die Wirbeltier-Optogenetik nachteiligen cyanobakteriellen Chromophor PCB (s. Abschnitt 1.2.6).

Die erfolgreiche Konstruktion von zwei synthetischen Bakteriophytochromen [226,244] macht die funktionale Fusion von Cyanobakteriochromen mit Zyklasen

oder Phosphodiesterasen vorstellbar [7]. Die chromophorbindende GAF-Domäne ist trotz natürlichen seriellen GAF-Multidomänen-Aufbaus photochemisch vollständig autark. Daher ist eine LAPD-Konstruktion mit einzelnen strukturell gelösten GAF-Photosensoren denkbar, z.B. aus *AnPixJ* und *TePixJ* [271]. Die Absorptionsbanden der stabilen Photozustände vieler Cyanobakteriochrome, z.B. die der B/G-Cyanobakteriochrome (vgl. Abbildung 5, Abschnitt 1.2.3), sind spektral stärker voneinander separiert als die der P_r - und P_{fr} -Zustände von BPhys. Die geringe spektrale Überlappung würde bei optogenetischer Anwendung zur effizienteren Photoschaltung zwischen den Zuständen und möglicherweise zu höheren Regulationsfaktoren führen [272]. Die GAF-Domänen sind ein Drittel so groß wie das PAS-GAF-PHY-Tandem, was beispielsweise eine bessere Packung in viralen Vektoren für die optogenetische Anwendung in Säugetieren erlauben würde [273].

Änderung des PDE-Moduls.

Für die optogenetische Anwendbarkeit von LAPD wäre es wünschenswert, cGMP- von cAMP-spezifischen Effekten in Modellorganismen zu diskriminieren; somit ist eine Erhöhung der Selektivität der cGMP- oder cAMP-Hydrolyse notwendig. In der Mutante PDE5-Q817A wurde das invariante Glutamin in der Substratbindungstasche durch Alanin ersetzt [188] (s. Abbildung 14B, Abschnitt 1.5.4). Die Mutation hatte eine 60-fache Senkung der cGMP- bei gleichbleibender cAMP-Affinität zur Folge [274]. Im LAPD-Kontext zeigte die homologe Mutation (LAPD-Q811A) im Vergleich zu LAPD-WT eine ~300-fache Reduktion der spezifischen Aktivität bezüglich der cGMP-Hydrolyse und eine nur ~13-fache hinsichtlich der cAMP-Hydrolyse (C. Wittig, Masterarbeit, 2014). Die Selektivität wurde damit ~20-fach gegenüber cAMP gesteigert, und somit eine cAMP-spezifische LAPD-Mutante generiert (*in vitro*). Eine Mutationsstudie zur isolierten katalytischen *HsPDE2A*-Domäne hatte cGMP- und cAMP-selektive Varianten ergeben [188]. Die Mutation Y827F der Substratbindungstasche (s. Abschnitt 1.5.4, Abbildung 14B: analoges Y683 ist in der katalytischen Tasche von PDE10A2 dargestellt) hatte bei mehr als 50% verbleibender Wildtyp-cGMP-Hydrolyseaktivität keine detektierbare cAMP-Hydrolyse zur Folge. Im LAPD-Kontext (Y779F) könnte diese Mutation also eine cGMP-spezifische LAPD erzielen. Im Gegensatz dazu eliminierte die Mutation Y827A die cGMP-Hydrolyse vollständig, konservierte jedoch noch zwischen 10-20% der cAMP-Hydrolyseaktivität der PDE2A-WT. Y827A könnte in LAPD (Y779A) zu einer cAMP-spezifischen Spe-

zies führen. Allgemein sind alle Mutationen der PDE-Domäne, die den T-Zustand von LAPD stabilisieren, d.h. die basale PDE-Aktivität senken (s. Abschnitt 4.1.4, Abbildung 47), testbar; auf diesem Weg könnte der Lichtregulationsfaktor erhöht werden.

Die effektorische PDE-Domäne kann innerhalb der Säuger-PDE-Superfamilie ebenfalls vollständig ausgetauscht werden, um enzymatische LAPD-Varianten zu erhalten. Die PDE5-Domäne wurde verwendet, um ein cGMP-spezifisches LAPD-Konstrukt zu generieren (vom Autor betreute Masterarbeit, C. Wittig, 2014); die Domänenarchitekturen von PDE5 und PDE2 sind homolog. BPhy-PDE5-Chimären ergaben aber kein zu LAPD analoges lichtaktiviertes Enzym. Gründe könnten die geringe spezifische Aktivität von PDE5 oder der unterschiedliche allosterische Aktivierungsmechanismus über cGMP-Bindung an die GAF-A-Domäne sein [275] (s. Abbildung 13A, Abschnitt 1.5.2). Die cGMP-spezifische PDE6 aus Säuger-Stäbchenzellen trägt ebenfalls ein zur *HsPDE2A*-WT homologes GAF-Sensormodul, wird aber über einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus aktiviert [174]. Dennoch ist eine Fusion von BPhy-PCD mit PDE6 zu unternehmen, um die hohe Hydrolyse-Aktivität in einem LAPD-Analogen zu konservieren (s. Abschnitt 1.5.2). Die cAMP-spezifische PDE8 trägt eine N-terminale PAS-Domäne [276]. Diese könnte analog zu YF1 durch die YtvA-LOV-Domäne anhand des konservierten DIT-Motivs ersetzt werden, um eine komplementäre blaulichtregulierte PDE zu erhalten [137]. Daneben existieren GAF-gekoppelte mikrobielle PDEs aus Bakterien und eukaryotischen Pathogenen [165]. *Trypanosoma brucei* PDE2B trägt ein N-terminales sensorisches GAF-Tandem und hydrolysiert cAMP hochselektiv [277]. *TbPDE2A* zeigt in Hefeextrakten eine qualitativ höhere Aktivität als Säuger-PDEs und könnte zur Konstruktion von LAPDs höherer PDE-Aktivität verwendet werden [278].

Eine weitere Modifikation betrifft die intrazelluläre Lokalisation von LAPD: Die kanonische PDE2A3-Sequenz trägt eine Targeting-Sequenz, welche das Vorläuferenzym an die Zellmembran dirigiert und dort über N-terminale Palmitoyl- und Myristoylreste verankert [203]. Das N-terminale *DrBPhy*-PAS-GAF-PHY-Tandem ist ein Photosensor eines zytosolischen Enzyms. LAPD ist daher vermutlich zytosolisch verteilt, wofür die Fluoreszenzmikroskopie von LAPD_EGFP-exprimierenden CHO-Zellen jedoch noch keinen eindeutigen Beleg erbrachte (s. Abschnitt 3.4.2, Abbildung 37D). Die Fu-

sion mit verschiedenen Targeting-Sequenzen kann die räumliche Präzision der optogenetischen Anwendung von LAPD auf subzelluläre Dimension erhöhen, um die Perturbation des zyklischen Nukleotidhaushalts in lokalen Kompartimenten aufzulösen.

LAPD-Aktivitätstests mit hohem Durchsatz.

LAPD-Varianten mit stringenter Substratspezifität und angepassten photochemischen Eigenschaften sind für die optogenetische Anwendung von großem Interesse. Die mannigfaltigen Rekombinationsmöglichkeiten, Mutagenesestrategien und Linkervariationen zur Erzeugung neuer LAPDs erfordern effektive Testmethoden. Voraussetzung für einen effizienten Aktivitätstest ist ein PDE-Assay von mittlerem bis hohem Durchsatz. Der fluoreszenzbasierte PDE-Assay wurde von C. Schumacher und H. Körschen (Cesar-Institut, Bonn) innerhalb eines durch den Autor betreuten Praktikums etabliert (Schumacher et al., *Optogenetics – Methods and Protocols*, Springer, 2015, *akzeptiert*). Der BCECF-basierte Assay für lysierte Expressionskultur ergänzt den HPLC-basierten Assay für gereinigtes Protein (s. Abbildung 18, Abschnitt 2.6.5). Die Fluoreszenz von BCECF wird mit sinkendem pH erniedrigt, und bei der Hydrolyse von 1 cNMP durch PDE wird 1 Proton freigesetzt. Daher ist die Aufnahme einer indirekten Echtzeitkinetik der cNMP-Hydrolyse möglich. Im Mikrotiterplatten-Lesegerät ist die Analyse mehrerer Reaktionsansätze gleichzeitig möglich. Durch Kalibrierung der Fluoreszenz mittels HPLC-Bestimmung der Substrat- und Produktkonzentrationen wurde der cGMP-Umsatz über die Fluoreszenzänderung quantitativ bestimmt (s. Abbildung 18, Abschnitt 2.6.5).

Zur Selektion von LAPD-Varianten in hohem Durchsatz wäre ein prokaryotischer *In-vivo*-Assay eine geeignete Methode. Der Aktivitätstest von IlaCs wurde in einem Adenylylzyklase-defizienten *E.-coli*-Stamm durchgeführt, wodurch die Selektion von $\sim 2 \times 10^5$ Klonen aus einer PCR-basierten Zufallsmutagenese unter D/L-Bedingungen möglich war [244]: Das lichtabhängig gebildete cAMP bindet den positiven Regulator des lac-Operons CAP (*catabolite activator protein*). Bei gleichzeitiger konstitutiver Entfernung des lac-Repressors von *lacI* durch IPTG wird die β -Galaktosidase-Expression induziert. Im IlaC-Assay wurde die β -Galaktosidase-Aktivität durch enzymatische Spaltung von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktopyranosid) im Kulturmedium kolorimetrisch nachgewiesen (das Spaltprodukt 5,5'-Dibrom-4,4'-

dichlor-indigo ist ein blauer Farbstoff). Ein Aktivitätstest von LAPD mit einem entsprechenden System erfordert eine zusätzliche konstitutive oder induzierbare Adenylylzyklaseaktivität (genomisch oder heterolog), die zunächst cAMP-Spiegel aufbaut, analog zur cGMP-Synthese durch den ANP-Rezeptor in der PDE-Reporterzelle (CHO). Das kolorimetrische Signal wäre bei voller Zyklaseaktivität maximal, und da eine funktionale LAPD-Spezies das synthetisierte cAMP lichtabhängig degradiert, würde sie zu einer Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität, d.h. X-Gal-Spaltung (Farblosigkeit), führen. Dieser Ansatz ließe sich mit einem fluoreszenzbasierten Reporterplasmid für Zyklasen kombinieren, das im Möglich-Labor generiert wurde (R. Ohlendorf, persönliche Mitteilung). Das Plasmid beinhaltet die Kontrollelemente des lac-Operons, wobei die Strukturgene lac Z, Y, A durch den Fluoreszenzreporter *DsRed* (*Discosoma striata* red fluorescent protein) ersetzt wurden [279]. Statt über die β -Galaktosidaseaktivität würde die PDE-Aktivität so direkter über die Expression von *DsRed* fluorimetrisch nachgewiesen werden. Da die innere Membran von *E. coli* für BV nicht permeabel ist, wäre die Koexpression einer Hämoxygenase für das Testen im prokaryotischen Assay erforderlich [157,241].

4.2.4 Ausblick: Optogenetik mit LAPD

Unter anderen sind folgende zukünftige Anwendungen von LAPD im *In-vivo*-Kontext denkbar:

Eine cAMP-spezifische LAPD-Variante könnte für die Analyse von cAMP-abhängigen Infektionszyklen in einzelligen Parasiten verwendet werden (vgl. Abschnitt 4.2.2). Ebenso könnten nach erwiesener Funktionalität in Zebrafischembryonen mit LAPD Stressantworten im adulten Tier analysiert werden (vgl. Abbildung 50, Abschnitt 4.2.2). In einer transgenen *C.-elegans*-Linie könnten LAPD und photoaktivierte Zyklasen (PACs) koexprimiert werden, um Neuronen durch ein optogenetisches Tandem zu kontrollieren. Auch könnten peristaltische Zirkulationsorgane in *Drosophila* optogenetisch untersucht werden; die cAMP-abhängige Schlagfrequenz der herzförmigen Gebilde könnte mit LAPD moduliert werden. Die cAMP-abhängige Bildung von hemopoetischen Stammzellen könnte ebenfalls optogenetisch analysiert werden. In retinalen Axonen könnte LAPD lichtabhängig cAMP-Spiegel modulieren.

Mit LAPD wurde ein neues orthogonales Werkzeug erstellt, für das Bedarf unter optogenetischen Anwendern besteht. LAPD könnte dazu beitragen, cAMP- und cGMP-abhängige Signaltransduktionswege zeitlich und räumlich aufzulösen.

Nicht veröffentlichte Daten von Interaktions- und Kooperationspartnern wurden für die elektronische Version der Dissertationsschrift aus der Diskussion entfernt.

5 Anhang

5.1 Strukturelles Alignment

5.1.1 Ausgabe des PDBe-Servers

```
>q|3IBJ_GAFBonly.pdb:A|3C2W_dimer_PHYonly.pdb:B
```

X-RAY STRUCTURE OF PDE2A

```
keqKLKCECQALLQVAKNLFTHL--DDV-VLLQEiitearNLSNAEICSVFLLdqnelVAKV
fdggvddesyeiripadqGIAGhv--TTGQILNIPDAyahplfstgfrTRNILCFPIKnen
qevIGVAELVNKi-----GPWFSKFDEDLATAFSIYCGISI
Ahslllykkvnea
```

```
>t|3C2W_dimer_PHYonly.pdb:B|3IBJ_GAFBonly.pdb:A
```

CRYSTAL STRUCTURE OF THE PHOTSENSORY CORE DOMAIN

```
---RIAE LLRVSTERR LALARR ArdADD lFGALAHpddgiaALIPCDGALVMLG-----RTL
sirgdf-----erqagNVLQrlqrdPERDIYHTDNW-----CGVLAIRFHrq-
--SGWIFWFRHeevtigpsgprltprgsfeawe evvrghSTPWSETDLAIAEKLRLDLMELC
Lnha-----
```

5.1.2 Initiale Fusionsstelle

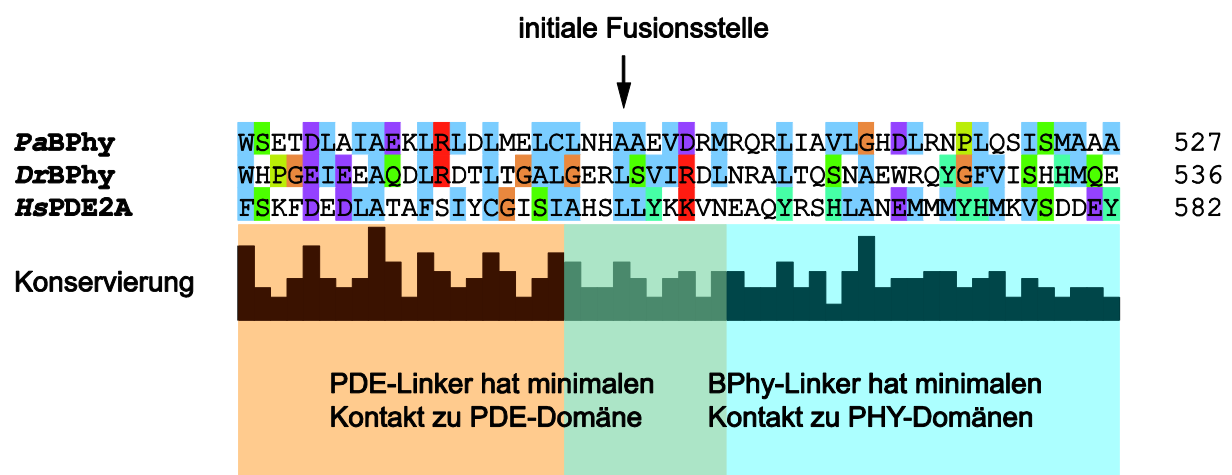


Abbildung 51. Initiale Fusionsstelle der Konstruktion von LAPD+2. Auf Grundlage des strukturbasierten Linkeralignments von *PaBPhy* und *HsPDE2A* wurde die initiale Fusionsstelle ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, die Struktur der GAF-, PHY- und PDE-Domänen nicht zu gefährden und die Schnittstelle an einem möglichst konservierten Aminosäurerest zu wählen. Die Sequenz von *DrBPhy* wurde entsprechend dem multiplen Sequenzalignment sämtlicher PHY-Domänen angelegt (Pfam-DatenbankPF00360).

5.1.3 Strukturmodell von LAPD

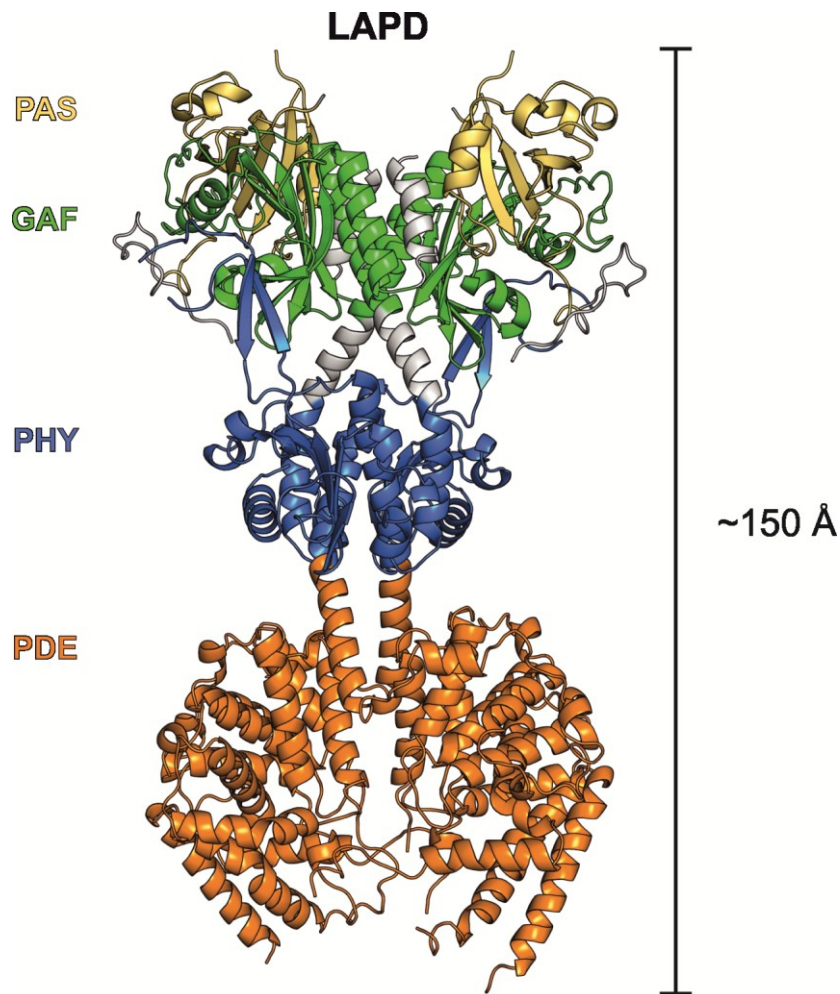


Abbildung 52. Modell von LAPD. Das Modell basiert auf der Struktur von dunkeladaptierter *DrBPhy*-PCD (PDB-Code: 4O0P) [250] und *HsPDE2A* ohne cGMP (PDB-Code: 3IBJ) [200]. PAS (gelb)-, GAF (grün)-, PHY (blau)-Domänen wurden mit PDE (orange) über die Aminosäurereste Leu 506 bzw. Lys 555 kovalent verbunden und das theoretische Addukt einer Energieminimierung unterzogen. Die axiale Entfernung von N- zu C-Terminus wurde mit ~150 Å abgeschätzt. Das Modell wurde von Dr. Florian Richter mit dem Programm Rosetta [280] konstruiert.

5.2 PaBPhy-HsPDE-Chimäre

Die initiale Fusionsvorschrift aus dem strukturellen Alignment mit *PaBPhy*-PCD [35] wurde als funktionale LAPD letztlich mit *DrBPhy*-PCD realisiert. Die Reinigung der theoretischen Chimäre aus Aminosäureresten 1-497 von *PaBPhy* und 553-941 von *HsPDE2A* war gegenüber LAPD aus folgenden Gründen interessant. Es wurde getestet, ob die Expression der ursprünglichen Fusion eine lichtregulierte PDE war und die *In-silico*-Konstruktionsvorschrift validiert wurde. Insbesondere wurde die Austauschbarkeit von BPhy-PCD getestet. Zweitens wurde die Aktivität von LAPD+2 und LAPD(0) mit der des Linkeranalogs aus *PaBPhy*_1-497 und *HsPDE2A*_553-941 (*PaBPD*+2) bzw. *HsPDE2A*_555-941 (*PaBPD*(0)) verglichen. Drittens wurde mit dem Bathyphytochrom ein LAPD-Analogon mit komplementärem FR/R-Photozyklus generiert.

5.2.1 Expression und Reinigung von *PaBPD*+2

PaBPD+2 wurde wie LAPD+2 im pASK43(+)-Kontext durch den *E.-coli*-Stamm BL21 überexprimiert. Das Standardprotokoll der LAPD-Reinigung ergab eine starke *PaBPD*+2-Überexpression in der unlöslichen Fraktion (Abbildung 53A, „P“); eine entsprechende Bande bei ~100 kDa fehlte jedoch in der SDS-PAGE-Analyse der löslichen Elutionsfraktion (Abbildung 53A&B).

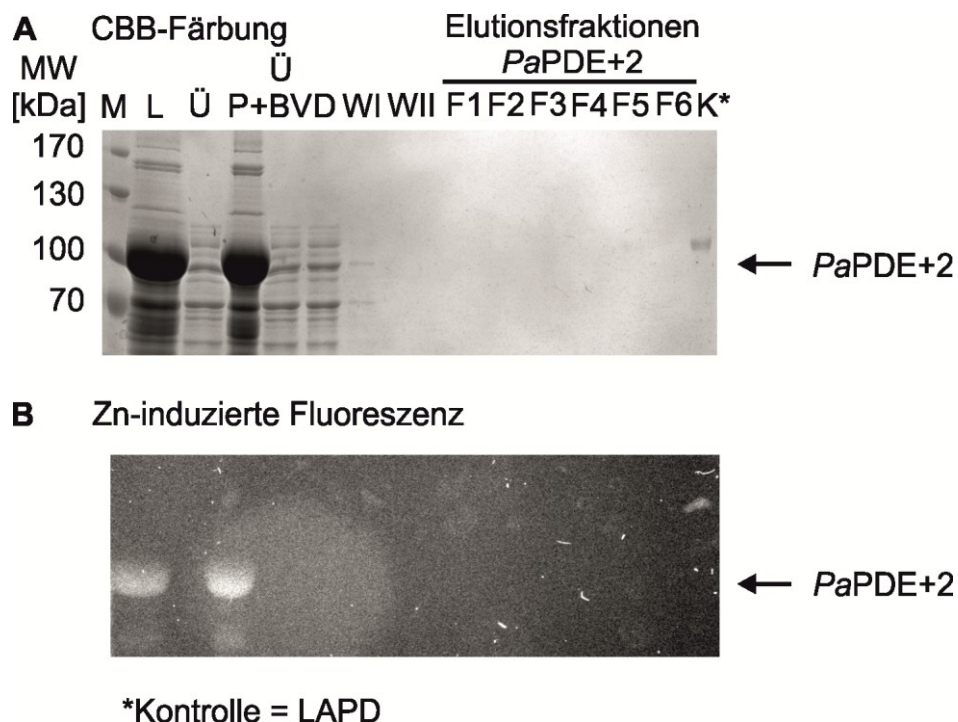


Abbildung 53. Expression von *PaBPD*+2. **A.** SDS-PAGE-Analyse (CBB-Färbung). **B.** Zn-induzierte Fluoreszenz.

Mit einer alternativen Aufschlussmethode wurden bei gleichen Expressionsbedingungen letztlich geringe Mengen von löslichem *PaBPD+2* erzielt. Statt der Zelllyse mit Ultraschall wurden die Zellen mit einem Microfluidizer (Emulsiflex, Avestin) nach Prinzip der Druckentspannung aufgebrochen (Abbildung 54A&B).

Die *PaBPD+2*-Probe (~100 kDa) war stark verunreinigt (Abbildung 54A) und zeigte ein niedriges Q-Banden/ A_{280} -Verhältnis von ~0,13 (Abbildung 54C). Im Vergleich dazu war das Q/ A_{280} -Verhältnis bei *PaBPhy*-WT-PCD ~1 (Q-Bande entspricht jeweils dem akkumulierten P_r -Zustand bei A_{700}) [35]. A_{280} ist eine Überlagerung der Absorption aromatischer Aminosäurereste und eines höheren BV-Übergangs ($S_0 \rightarrow S_x$; für $x > 2$). Welche Anteile am niedrigen Q/ A_{280} -Quotienten durch einen reduzierten BV-Einbau oder Verunreinigungen bedingt sind, ist daher ohne Denaturierung nicht zu quantifizieren.

5.2.2 UV/vis-Spektroskopie von *PaBPD+2*

Die erhaltene *PaBPD+2*-Probe zeigte ein UV/vis-Absorptionsspektrum mit BPhy-Signatur. Die Absorption bei ~400 nm war ungewöhnlich hoch. Das Verhältnis von Q (A_{700})- zu Soret (A_{max})-Bande betrug ~0,5 (*PaBPD+2* im P_r -Zustand akkumuliert) (Abbildung 54C). Zum Vergleich betrug die Q (A_{700})/Soret (A_{max})-Ratio unter saturierendem FR-Licht ~2,1 [35]. Das deutet entweder auf ein strukturell verändertes PCD-Modul, d.h. veränderte BV-Konformation, in *PaBPD+2* [70] oder eine Verunreinigung der Probe mit bakteriellen Cytochromen hin. Cytochrome aus *E.-coli*-Expressionsstämmen sind bei Isolierung anderer Photorezeptoren Verunreinigungen zugeordnet worden [281]. Die hohe Absorption bei ~400 nm könnte durch Überlagerung der Soret-Banden von Phytochrom (bei $\lambda \sim 400$ nm) und Cytochrom (bei $\lambda \sim 408$ nm) entstanden sein. Die für Phytochrome untypische Schulter an der langwelligen Flanke der Soret-Bande bei $\lambda \sim 450$ nm könnte durch reduziertes Cytochrom bedingt sein [282], da die *PaBPD+2*-Reinigung in reduzierendem Medium mit β -Mercaptoethanol durchgeführt wurde. Die Molekulargewichte von ca. 50-35 kDa untermauern die Zuordnung zur Cytochrom-Fraktion (Abbildung 54A).

Dunkeladaptierte *PaBPD+2*-Probe (während Dialyse über Nacht) zeigte einen ausgeprägten P_r/P_{fr} -Mischzustand im Gleichgewicht mit einem A_{751}/A_{700} -Verhältnis von ~0,9 (Abbildung 54C). Der gleiche Quotient wurde für isoliertes Apo-*PaBPhy*-WT nach Rekonstitution *in vitro* mit BV nach 3 h im Dunkeln beschrieben [247]. Dagegen zeigte sowohl Vollängen-*PaBPhy*-WT als auch isolierte *PaBPhy*-WT-PCD im

dunkeladaptierten Zustand einen vollständig akkumulierten P_{fr} -Zustand mit nur leichter P_r -Schulter [35,99].

5.2.3 Photochemie von *PaBPD+2*

PaBPD+2 wurde durch R- und FR-Licht reversibel in den P_{fr} - bzw. P_r -Zustand überführt (Abbildung 54C). Durch Bestrahlung mit FR-Licht (850-nm-LED) erfolgte eine quantitative Konversion von $P_{fr} \rightarrow P_r$. Umgekehrt führte die Beleuchtung mit R-Licht der vorliegenden LEDs und Interferenz-Filter (670 und 650 nm) nur zu einer partiellen $P_r \rightarrow P_{fr}$ -Konversion (A_{751}/A_{700} -Quotient $\sim 0,4$). Die Anregung von *PaBPhy*-WT hatte einen ähnlichen Befund ergeben: FR-Licht (750 nm) trieb die vollständige Umwandlung in den P_r -Zustand an, hingegen ergab Bestrahlung mit R-Licht (630 nm) einen A_{751}/A_{700} -Quotienten von $\sim 0,6$ [247]. Im Gegensatz dazu hatten isolierte *PaBPhy*-WT und *PaBPhy*-PCD im dunkeladaptierten Zustand einen stark akkumulierten P_{fr} -Zustand (A_{751}/A_{700} -Quotienten $\sim 1,4$) [35,99].

Die thermische Rückkehr von *PaBPD+2* erfolgte nach FR-Anregung (850-nm-LED) aus dem vollständig akkumulierten P_r -Zustand in den dunkeladaptierten P_{fr}/P_r -Mischzustand. Die Reversion des Ausgangszustands war mit einem A_{751}/A_{700} -Quotienten von $\sim 0,9$ nach 14 h nahezu vollständig (isosbestischer Punkt bei 719 nm). Im Vergleich dazu hatte *PaBPhy*-WT nach Anregung mit FR-Licht (750 nm) einen A_{751}/A_{700} -Quotienten von $\sim 1,1$ nach 18 h Dunkeladaptation erreicht [247]. Die *PaBPhy*-PCD hatte nach Anregung mit FR-Licht (750 nm) schon nach 5 min eine vollständige Reversion in den Dunkelzustand mit starker P_{fr} -Akkumulation gezeigt [35].

5.2.4 Enzymatische Aktivität von *PaBPD+2*

Die Hydrolyse von cGMP durch gereinigte *PaBPD+2* wurde in einem Fluoreszenzbasierten PDE-Assay im Mikrotiterplatten-Lesegerät in Echtzeit verfolgt. *PaBPD+2* war unabhängig von der Beleuchtung konstitutiv aktiv und bewegte sich im Vergleich zu 150-fach verdünnter LAPD auf einem basalen Niveau (Abbildung 54D).

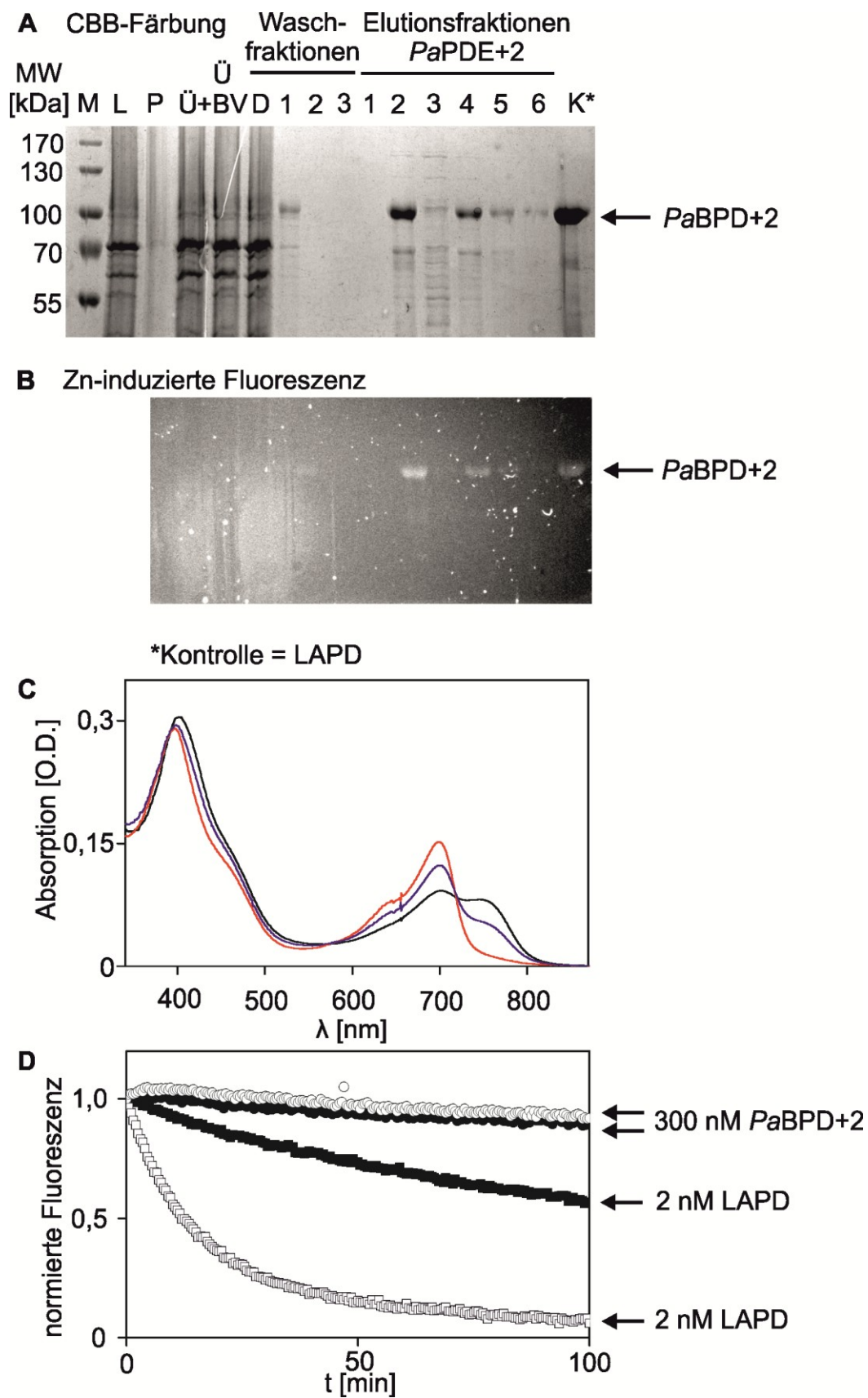


Abbildung 54. Charakterisierung von *PaBPD+2*. **A.** SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von *PaBPD+2* (CBB-Färbung). **B.** Zn-induzierte Fluoreszenz. **C.** UV/vis-Spektrum von *PaBPD+2*, dunkel- (schwarze Kurve), rotlicht- (670-nm-LED, blaue Kurve) und fernrotlichtadaptiert (850-nm-LED, rote

Kurve). **D.** Enzymatische Aktivität von *PaBPD+2* im BCECF-Assay, dunkeladaptiert (geschlossene Kreise) und rotlicht- bzw. fernrotlichtadaptiert (offene Kreise) (in Zusammenarbeit mit C. Schumacher).

5.3 Wildtyp- und Fusionssequenzen

PaBPhy-WT (Q9HWR3-1)

Aminosäurereste

MTSITPVTLANCEDPIHVPGAIQPHGALVTLRADGMVLAASENIQALLGFVASPGSYLTQEQVGPEVLRMLEEG
 LTGNPWSNSVETRIGEHLFDVIGHSYKEVFYLEFEIRTADTLSITSFTLNAQRIIAQVQLHNDTASLLSNVTDE
 LRRMTGYDRVMAYRFRHDDSGEVVAESRREDLESYLGQRYPASDIPAQARRLYIQNPIRLIADVAYTPMRVFPAL
 NPETNESFDLSYSVLRVSPIHCEYLTNMGVRASMSISIVVGKWLWGLFSCHHMSPKLIPYPVRMSFQIFSQVCS
 AIVERLEQGRIAE LLRVSTERRLALARRARDADDLFGALAHPPDGIAALIPCDGALVMLGGRTLSIRGDFERQAG
 NVLQRLQRPDIYHTDNWPQPSSESDPDGGDCCGVLAIRFHRQESGWIFWFRHEEVHRIRWGGKPEKLLTIGPS
 GPRLTGRGSFEAWEEVVRGHSTPWSETDLAIAEKLRLDLMECLCNHAAEVDMMRQRLIAVLGHDLRNPLQSI SMA
 AALLSSSDTRTTELRLQHSASSSRMERLVSQILDMSRLQSGIGLTVNPVDTDVSQVLVRQIVCETDVAYPGLVIEI
 AIDPQVRVAVDPDRYAQVAANLLSNARHHGLPGRPVLTTLTRQGDEVCLSVLNETSGLSEAQLANLFEFPFKRESA
 DNQRNRNGLGIGLYISQAIAQAHQGRIDVDCRDDVITFCLRLPVRQAETGSSS

DNA

ATGACGAGCATCACCCCGGTTACCCTGGCGAACTGCGAGGACGAACCCATCCACGTGCCTGGCGCGATCCAGCCG
 CACGGGGCGCTGGTCACCCTGCGCGCGGACGGCATGGTCCTCGCGGCAAGCGAGAACATCCAGGCGCTACTGGGG
 TTCGTGCGCTCGCCGGGTTCTACCTGACGCAGGAGCAGGTGGGGCCGGAGGTCTGCGCATGCTCGAAGAGGGA
 CTGACCGGCAACGGCCCATGGTCAACAGCGTCGAGACGCGGATCGGCGAACACCTGTTGACGTGATCGGCCAC
 AGCTACAAGGAAGTGTTCTACCTGGAGTTCGAGATCCGACCGCGGACACGCTGTGATCACCTCCTTCACCCTC
 AACGCCCAGCGCATCATCGCCAGGTCCAGTTGCACAACGACACCGCCAGCCTGCTCAGCAACGTCACCGACGAA
 CTGCGCCGGATGACCGGCTACGACCGGGTGATGGCCTACCCTTCCGCCATGACGACTCCGGCGAGGTGGTCGCC
 GAGAGCCGTGCGAAGACCTCGAAAGCTACCTGGGGCAACGCTACCCGGCCTCGGACATCCCGGCCAGGCGCGT
 CGCCTGTACATCCAGAACCCGATCAGGCTGATCGCCGACGTGGCCTATACGCCGATGCGCGTGTTTCCCGCGCTG
 AACCCGGAGACCAACGAATCGTTGATCTCAGCTACAGCGTGCTGCGCAGCGTTTCGCCGATCCACTGCGAATAC
 CTGACCAACATGGGCGTGCGCGCCTCGATGAGCATCTCCATCGTGGTGGCGGCAAGCTCTGGGGACTGTTCTCC
 TGCCATCACATGTGCCCCAACTGATTCCCTACCCGGTGCGCATGTCTGTTCCAGATCTTCTCCCAGGTCTGCAGC
 GCCATCGTCGAGCGCCTGGAGCAGGGGCGTATCGCCGAACCTGCTGCGCGTGTCACCGAGCGCAGGCTGGCCCTG
 GCTCGCCGCGCGCGGGACGCCGACGACCTGTTTCGGCGCACTGGCCACCCGGACGATGGCATCGCCGCACTGATT
 CCCTGCGACGGCGCCCTGGTCATGCTCGGCGGCCGACCCCTGAGCATCCGCGGCGACTTCGAGCGCCAGGCCGGG
 AATGTCCTGCAACGCTGCAGCGCGACCCGGAACGGGACATCTACCACACCGACAACCTGGCCGAGCCAGCGAG
 GACTCTCCGGACGGCGGCGACTGCTGCGGTGTGCTGGCGATCCGTTTCCACCGCCAGGAATCGGGCTGGATCTTC
 TGGTTCCGCCACGAGGAAGTGACCGCATCCGCTGGGGCGGCAAGCCGGAAGCTGTTGACCATCGGGCCCTCC
 GGCCCGCGGCTGACCCCGCGCGGCTCGTTTCGAGGCTGGGAGGAAGTGGTCCGCGGCCACTCCACGCCCTGGAGC
 GAAACCGACCTGGCGATCGCCGAAAAGCTGCGCCTGGACCTGATGGAACGTGTCCTCAACCATGCGGCCGAGGTG
 GACCGCATGCGCCAGCGCCTGATCGCGGTGCTCGGCCACGACCTGCGCAACCCGTTGCAGTCGATCTCCATGGCG
 GCGGCCCTGCTGTCTCCAGCGACACCCGCACACCGAACTGCGCCAACACATTTCCGCGTCCAGCAGCCGCATG
 GAGCGGCTGGTCAGCCAGATCCTCGACATGAGCCGCTGCAATCGGGCATCGGCCTCACCGTGAACCCGGTGCAG
 ACCGACGTCTCGCAACTGGTGCGGCAGATCGTCTGCGAAACCGACGTGCGCTATCCCGGCCTGGTGATCGAGATC
 GCCATCGACCCGAGGTTCTGTGCGGTGGTCGACCCGGACCGCTACGCCCAGGTGCGCGCAACCTGCTGAGCAAC
 GCGCGTCATCACGGCTGCGCGGCCGGCGGTGCTGGTCACCCTGACCCGCCAGGGCGACGAGGTGTGCTGAGC
 GTGCTCAACGAAACAGCGGCCTCTCCGAAGCGCAGCTGGCCAACCTGTTGCAACCGTTCAAGCGCGAGTCGGCG
 GACAACAGCGCAACCGCAACGGCCTCGGTATCGGCCTGTACATCTCCAGGCCATCGCCAGGCCACCAGGGG
 CGTATCGACGTGGACTGCCGCGACGACGTCATCACCTTCTGCCTGCGCCTGCGCGGTGCGCCAGGCGGAGACCGG
 TCCTCGTCCTGA

DrBPhy-WT (Q9RZA4-1)**Aminosäurereste**

MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSINAATFLGQEPTVLRGQTLA
 ALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAGHLSLTVHRVGELLILEFEPTAWDSTGPHALRNMFALESA
 PNLRALAEVATQTVRELTFGDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRHLLRLTA
 DTRAAVPLDPVLNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSLSVSVVVGGLWGLIACHHQTPYVLPDP
 LRTTLEYLGRLLSLQVQVKEAADVAEFRQSLREHHARVALAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRFEGR
 WQTLGEVPPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEGWSECLVWLRPELRLEVA
 WGGATPDQAKDDLGPRLHSFDTYLEEKRGYAEPWHPGEIEEAQDLRDLTTLTGALGERLSVIRDLNRALTQSNAEWRQ
 YGFVISHMQEPVRLISQFAELLTRQPRADGSPDSPQTERITGFLRETSRLRSLTQDLHTYTALLSAPPPVRR
 PTPLGRVDDVLQDLEPRIADTGASIEVAPELPVIAADAGLLRDLHLHIGNALTGGGPEPRIAVRTERQAGAWS
 IAVSDQAGIAPEYQERIFLLFQRLGSLDEALGNGLGLPLCRKIAELHGGTLTVESAPGEGSTFRCLWLPDAGPLP
 GAADA

DNA

ATGAGCCGGGACCCGTTGCCCTTTTTTCCACCGCTTTACCTTGGTGGCCCGGAAATTACCACCGAGAACTGCGAG
 CGCGAGCCGATTATATTCCCGGCAGCATCCAGCCGCACGGCGCCCTGCTCACTGCCGACGGGCACAGCGGCGAG
 GTGCTCCAGATGAGCCTCAACGCGGCCACTTTTCTGGGACAGGAACCCACAGTGCTGCGCGGACAGACCCCTCGCC
 GCACTGCTGCCCGAGCAGTGGCCCGCGCTGCAAGCGGCCCTGCCCCCGGCTGCCCCGACGCCCTGCAATACCGC
 GCAACGCTGGACTGGCCTGCCGCGGGGACCTTTGCTGACGGTGCACCGGGTCGGCGAGTTGCTGATTCTGGAA
 TTCGAGCCGACGGAGGCCTGGGACAGCACCGGGCCGCACGCGCTGCGCAACGCGATGTTGCGCGCTCGAAAGTGCC
 CCAAACCTGCGGGCGCTGGCCGAGGTGGCGACCCAGACGGTCCGCGAGCTGACGGGCTTTGACCGGGTGATGCTC
 TACAAATTTGCCCCGACGCCACCGGCGAAGTGATTGCCGAGGCCCGCCGTGAGGGGCTGCACGCCCTTTCTGGGC
 CACCGTTTTCCCGCGCTCGGACATTCCGGCGCAGGCCCCGCGCTCTACACCCGGCACCTGCTGCGCCTGACCGCC
 GACACCCGCGCCGCCCGCTGCCGCTCGATCCCGTCTCAACCCGACAGCAATGCGCCCACCCGCTGGGCGGC
 GCCGTGCTGCGCGCCACCTCGCCCATGCACATGCAGTACCTGCGGAACATGGGCGTCGGGTGAGCCTGTGCGGTG
 TCGGTGGTGGTGGCGGCCAGCTCTGGGGCCTGATCGCCTGCCACCACCAGACGCCCTACGTGTTGCCCGCCGAC
 CTGCGAACCACGCTCGAATACCTGGGCCGCTTGCTGAGCCTGCAAGTTCAGGTCAAGGAAGCGGCGGACGTGGCG
 GCCTTTTCGCCAGAGCCTGCGGGAGCACACGCGCGGGTGGCCCTCGCGGCGGCGCACTCGCTCTCGCCGCACGAC
 ACCCTCAGTGACCCGGCGCTTGACCTGCTGGGCCTGATGCGGGCCGGGGCCTGATTCTGCGTTTCGAGGGCCGC
 TGGCAGACGTTGGGTGAAGTGCCGCTGCCCGCGGGTGGACGCGCTGCTGGCGTGCTCGAAACCCAGCCGGGC
 GCCCTGGTCCAGACCGACGCGCTGGGCCAACTGTGGCCCGCGGCGCCGATCTCGCCCCAGCGCAGCGGGCCTG
 CTCGCCATCAGCGTGGGCGAGGGCTGGTCCGAGTGCCTCGTCTGGCTGCGGCCCGAACTGCGGCTGGAGGTGCGC
 TGGGGCGGGGCCACTCCTGACCAGGCGAAAGACGACCTCGGGCCGCGCCACTCATTCGACACCTACCTCGAAGAA
 AAACGCGGCTACGCCGAGCCCTGGCATCCCGGCGAAATCGAGGAGGCGCAGGATCTACGTGACACATTGACCGGG
 GCGCTGGGCGAGCGCTGAGCGTGATTCTGTGACCTCAACCGGGCGCTCACACAGTCGAACGCCGAGTGGCGGCAG
 TACGGCTTCGTTATCAGCCACCACATGCAGGAGCCGGTGGCGCTCATCTCGCAGTTCGCCGAGTTGCTGACGCGC
 CAGCCCCGCGCCAGGACGGGTCTCCGACTCTCCGACAGCCAGCGCATCACCGGCTTTCTGCTGCGCGAAACG
 TCGCGCCTGCGCAGCCTGACGCAAGACCTCCACACCTACACCGCGCTGCTCTCGGCACCGCCCGGCTGCGCCGC
 CCCACGCCGCTGGGCCGCGTGGTGGACGATGTGCTGCAAGACCTCGAACCCCGCATTGCCGACACCGGAGCGAGC
 ATCGAGGTGGCGCCCGAGTTGCCCGTTCATCGCTGCCGACGCTGGCCTGCTGCGCGACCTGCTGCTGCATCTGATC
 GGCAACGCGCTGACGTTTGGTGGCCCGGAGCCGCGTATTGCCGTAAGGACCGAACGGCAAGGCGCGGTTGGTCT
 ATCGCGGTGAGTACCAGGGCGCTGGCATCGCGCCCGAGTATCAGGAACGAATCTTTCTGCTGTTTCAGCGGCTC
 GGTTCGCTCGATGAGGCGCTGGGCAACGGCCTGGGCCTGCCGCTGTGCCGCAAGATCGCCGAACATGCATGGCGGC
 ACCCTGACCGTGGAGTCCGCGCCAGGCGAGGGCAGCACCTCCGTTGCTGGCTGCCCGATGCTGGGCCTCTTCCG
 GGAGCCGCCGATGCCTGA

HsPDE2A3-WT (O00408-1)**Aminosäurereste**

MGQACGHSILCRSQQYPAARPAEPRGQQVFLKPDEPPPPPPQPCADSLQDALLSLGVIDISGLQRAVKEALSAVL
 PRVETVYTYLLDGESQLVCEDPPHELPOEGKVREAIISQKRLGCNGLGFSDLPKGKPLARLVAPLAPDTQVLVMP
 ADKEAGAVAAVILVHCGQLSDNEEWSLQAVEKHTLVALRRVQVLQQRGPREAPRAVQNPPEGTAEDQKGGAAAYTD
 RDRKILQLCGELYDLDASSLQKVLQYLQOETRASRCCLLLVSEDNLQLSCKVIGDKVLGEEVSFPLTGCLGQVV
 EDKKSILQKDLTSEDVQQLQSMLGCELQAMLCVPVISRATDQVVALACAFNKLEGLDFTDEDEHVIQHCFFHYTST
 VLTSTLAFQKEQKLCCEQALLQVAKNLFTHLDDVSVLLQEIITEARNLSNAEICSVFLLDQNELVAKVFDGGVV
 DDESYEIRIPADQGIAGHVATTGQILNIPDAYAHPLFYRGVDDSTGFRTRNILCFPIKNENQEVIGVAELVNKIN
 GPWFSKFDEDLATAFSIYCGISIAHSLLYKKVNEAQYRSHLANEMMMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNF
 ASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMQDMNFINNYKIDCPTLARFCLMVKKGYRDPYHNWMHAFSVSHFCYLLLYKNL
 ELTNYLEDIEIFALFISCMCHDLDRGTTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSMERHHFAQAIAILNTHGCNIFDHS
 RKDYQRMQLDLMRDIIILATDLAHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNQHHRLLLCLLMTSCDLSLQTKGWKTTRKIAEL
 IYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIPELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNREHWTKVSH
 KFTIRGLPSNNSLDFLDEEYEVDPDLGTRAPINGCCSLDAE

DNA

ATGGGGCAGGCATGCGGCCACTCCATCCTCTGCAGGAGCCAGCAGTACCCGGCAGCGCGACCGGCTGAGCCGCGG
 GGCCAGCAGGTCTTCTCAAGCCGGACGAGCCGCCGCCGCCGCCGAGCCATGCGCCGACAGCCTGCAGGACGCC
 TTGCTGAGTCTGGGCTCTGTCTACGACATTTTCAGGCCTGCAACGTGCTGTCAAGGAGGCCCTGTGAGCTGTGCTC
 CCCCAGTGGAACTGTCTACACCTACCTACTGGATGGTGAGTCCCAGCTGGTGTGTGAGGACCCCCCACATGAG
 CTGCCCCAGGAGGGGAAAGTCCGGGAGGCTATCATCTCCAGAAGCGGCTGGGCTGCAATGGGCTGGGCTTCTCA
 GACCTGCCAGGAAGCCCTTGGCCAGGCTGGTGGCTCCACTGGCTCCTGATACCCAAGTGCTGGTCATGCCGCTA
 GCGGACAAGGAGGCTGGGGCCGTGGCAGCTGTCTCTTGGTGCACTGTGGCCAGCTGAGTGATAATGAGGAATGG
 AGCCTGCAGGCGGTGGAGAAGCATAACCCTGGTCGCCCTGCGGAGGGTGCAAGTCTGCAGCAGCGCGGGCCCAGG
 GAGGCTCCCCGAGCCGTCCAGAACCCCCCGAGGGGACGGCGGAAGACCAGAAGGGCGGGGCGGTACACCGAC
 CGCGACCGCAAGATCCTCCAAGTGTGCGGGAACTCTACGACCTGGATGCCTCTTCCCTGCAGCTCAAAGTGCTC
 CAATACCTGCAGCAGGAGACCCGGGCATCCCGCTGCTGCCTCCTGCTGGTGTGCGGAGGACAATCTCCAGCTTTCT
 TGCAAGGTCTATCGGAGACAAAGTGCTCGGGGAAGAGGTGAGCTTTCCCTTGACAGGATGCCTGGGCCAGGTGGTG
 GAAGACAAGAAGTCCATCCAGCTGAAGGACCTCACCTCCGAGGATGTACAACAGCTGCAGAGCATGTTGGGCTGT
 GAGCTGCAGGCCATGCTCTGTGTCCCTGTCTATCAGCCGGGCCACTGACCAGGTGGTGGCCTTGGCCTGCGCCTTC
 AACAGCTAGAAGGAGACTTGTTACCGACGAGGACGAGCATGTGATCCAGCACTGCTTCCACTACACCAGCACC
 GTGCTCACCAGCACCCTGGCCTTCCAGAAGGAACAGAACTCAAGTGTGAGTGCCAGGCTCTTCTCCAAGTGGA
 AAGAACCTCTTACCCACCTGGATGACGTCTCTGTCTGCTCCAGGAGATCATCACGGAGGCCAGAAACCTCAGC
 AACGCAGAGATCTGCTCTGTGTTCTGCTGGATCAGAATGAGCTGGTGGCCAAGGTGTTTCGACGGGGGCGTGGTG
 GATGATGAGAGCTATGAGATCCGCATCCCGGCCGATCAGGGCATCGCGGGACACGTGGCGACCACGGGCCAGATC
 CTGAACATCCCTGACGCATATGCCCATCCGCTTTTCTACCGCGGCGTGGACGACAGCACCAGGCTTCCGCACGCGC
 AACATCCTCTGCTTCCCCATCAAGAACGAGAACCAGGAGGTATCGGTGTGGCCGAGCTGGTGAACAAGATCAAT
 GGGCCATGGTTTCAGCAAGTTCGACGAGGACCTGGCGACGGCCTTCTCCATCTACTGCGGCATCAGCATCGCCCAT
 TCTCTCCTATACAAAAAGTGAATGAGGCTCAGTATCGCAGCCACCTGGCCAATGAGATGATGATGTACCACATG
 AAGGTCTCCGATGATGAGTATACCAAACCTTCTCCATGATGGGATCCAGCCTGTGGCTGCCATTGACTCCAATTTT
 GCAAGTTTACCTATACCCCTCGTTCCCTGCCCCGAGGATGACACGTCCATGGCCATCCTGAGCATGCTGCAGGAC
 ATGAATTTTCATCAACAACTACAAAATTGACTGCCCCGACCCTGGCCCCGTTCTGTTTGATGGTGAAGAAGGGCTAC
 CGGGATCCCCCTACCACAACTGGATGCACGCCTTTTCTGTCTCCACTTCTGCTACCTGCTCTACAAGAACCTG
 GAGCTACCAACTACCTCGAGGACATCGAGATCTTTGCCTTGTTTATTTTCTGCTGCTGCTGATGACCTGGACCAC
 AGAGGCACAAACAACTCTTTCCAGGTGGCCTCGAAATCTGTGCTGGCTGCGCTCTACAGCTCTGAGGGCTCCGTC
 ATGGAGAGGCACCACTTTGCTCAGGCCATCGCCATCCTCAACACCCACGGCTGCAACATCTTTGATCATTTCTCC
 CGGAAGGACTATCAGCGCATGCTGGATCTGATGCGGGACATCATCTTGGCCACAGACCTGGCCACCATCTCCGC

ATCTTCAAGGACCTCCAGAAGATGGCTGAGGTGGGCTACGACCGAAACAACAAGCAGCACCACAGACTTCTCCTC
 TGCCTCCTCATGACCTCCTGTGACCTCTCTGACCAGACCAAGGGCTGGAAGACTACGAGAAAGATCGCGGAGCTG
 ATCTACAAAGAATTCTTCTCCCAGGGAGACCTGGAGAAGGCCATGGGCAACAGGCCGATGGAGATGATGGACCGG
 GAGAAGGCCTATATCCCTGAGCTGCAAATCAGCTTCATGGAGCACATTGCAATGCCCATCTACAAGCTGTTGCAG
 GACCTGTTCCCCAAAGCGGCAGAGCTGTACGAGCGCGTGGCCTCCAACCGTGAGCACTGGACCAAGGTGTCCAC
 AAGTTCACCATCCGCGGCCTCCCAAGTAACAACCTCGCTGGACTTCTGGATGAGGAGTACGAGGTGCCTGATCTG
 GATGGCACTAGGGCCCCCATCAATGGCTGCTGCAGCCTTGATGCTGAGTGA

LAPD_6xHis in pASK43(+) – *E.-coli*-adaptiert

Aminosäurereste

MASMSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSLNAAATFLGQEPTVLRGQ
 TLAALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAGHLSLTVHRVGELLILEFEPTAEWDSTGPHALRNAMFAL
 ESAPNLRALAEVATQTVRELTFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAF LGHRFPASDI PAQARALYTRHLLR
 LTADTRAAVPLDPVLNPQTNPATPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVSSLSVSVVVGGQLWGLIACHHQTPYVL
 PPDRLTTLEYLGRLLSLQVQVKEAADVAAFRQSLREHHARVALAAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRF
 EGRWQTLGEVPPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEGWSECLVWLRPELRL
 EVAWGGATPDQAKDDLGRHSFDTYLEEKRGYAEPWHPGEIEEAQDLRDLTGALGERLKKVNEAQYRSHLANEM
 MMYHMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQDMNFINNYKIDCPTLARFCLM
 VKKGYRDPYPYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLEDIEIFALFISCMCHDLDRGTNNSFQVASKSVLAALYS
 SEGSMERHHFAQAIAILNTHGCNIFDHFSRKDYQRMLDLMRDIILATDLAHLRLIFKDLQKMAEVGYDRNNKQH
 HRLLLCLLMTSCDLSQTKGWKTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIPELQISFMEHIAMPI
 YKLLQDLFPKAAELYERVASNGEHWTKVSHKFTIRGIPSNNSLDFLDEEYEVPLDGTTRAPINGCCSLDAEHHHH
 HH

DNA

ATGGCTAGCATGAGCCGGGACCCGTTGCCCTTTTTTCCACCGCTTTACCTTGGTGGCCCGGAAATTACCACCGAG
 AACTGCGAGCGCGAGCCGATTTCATATTCCCGGCAGCATCCAGCCGCACGGCGCCCTGCTCACTGCCGACGGGCAC
 AGCGGCGAGGTGCTCCAGATGAGCCTCAACGCGGCCACTTTTCTGGGACAGGAACCCACAGTGCTGCGCGGACAG
 ACCCTCGCCGCACTGCTGCCGAGCAGTGGCCCGCGCTGCAAGCGGCCCTGCCCCCGGCTGCCCCGACGCCCTG
 CAATACCGCGCAACGCTGGACTGGCTGCCGCCGGGCACCTTTCGCTGACGGTGACCGGGTCGGCGAGTTGCTG
 ATTCTGGAATTCGAGCCGACGGAGGCCTGGGACAGCACCAGGCGCGACGCGCTGCGCAACGCGATGTTGCGGCTC
 GAAAGTGCCCCAACCTGCGGGCGCTGGCCGAGGTGGCGACCCAGACGGTCCGCGAGCTGACGGGCTTTGACCGG
 GTGATGCTCTACAAATTTGCCCGGACGCCACCGGCGAAGTGATTGCCGAGGCCCCGCGTGAGGGGCTGCACGCC
 TTTCTGGGCCACCGTTTTTCCCGCGTCGGACATTCCGGCGCAGGCCCCGCGCGCTCTACACCCGGCACCTGCTGCGC
 CTGACCGCCGACACCCGCGCCGCGCCGCTGCCGCTCGATCCCGTCTCTCAACCCGCGAGACGAATGCGCCACCCCG
 CTGGGCGGCGCCGTGCTGCGCGCCACCTCGCCCATGCACATGCAGTACCTGCGGAACATGGGCGTCGGGTGAGC
 CTGTGCGGTGTGCGGTGGTGGTGGCGGCCAGCTCTGGGGCCTGATCGCCTGCCACCACCAGACGCCCTACGTGTTG
 CCGCCCGACCTGCGAACCACGCTCGAATACCTGGGCGCTTGCTGAGCCTGCAAGTTCAGGTCAAGGAAGCGGCG
 GACGTGGCGGCCTTTGCGCAGAGCCTGCGGGAGCACCACGCGCGGGTGGCCCTCGCGGCGGCGCACTCGCTCTCG
 CCGCACGACACCCTCAGTGACCCGGCGCTTGACCTGCTGGGCCTGATGCGGGCGGGGGCCTGATTCTGCGTTTC
 GAGGGCCGCTGGCAGACGTTGGGTGAAGTGCCGCTGCCCCGGCGGTGGACGCGCTGCTGGCGTGGCTCGAAACC
 CAGCCGGGCGCCCTGGTCCAGACCGACGCGCTGGGCCAACTGTGGCCCGCGGCGCCGATCTCGCCCCAGCGCA
 GCGGGCCTGCTCGCCATCAGCGTGGGCGAGGGCTGGTCGGAGTGCCTCGTCTGGCTGCGGCCCCGAAGTGGCGCTG
 GAGGTGCGCTGGGGCGGGGCCACTCCTGACCAGGCGAAAGACGACCTCGGGCCGCGCCACTCATTCGACACCTAC
 CTCGAAGAAAAACGCGGTACGCCGAGCCCTGGCATCCCGGCGAAATCGAGGAGGCGCAGGATCTACGTGACACA
 TTGACCGGGGCGCTGGGCGAGCGCCTGAAAAAAGTGAACGAGGCCCAGTATCGCTCTCATCTGGCAAACGAAATG
 ATGATGTATCACATGAAAGTGTCCGACGACGAGTATACAAACTGCTGCACGATGGCATTCAACCTGTTGCTGCT
 ATTGACTCCAACCTTCGCTTCCTTCACCTATACACCAGTTCTCTGCCGGAGGATGACACCTCTATGGCTATCCTG

AGCATGCTGCAAGACATGAACTTTATCAACAACCTATAAAATCGACTGCCCCGACCCTGGCTCGCTTCTGTCTGATG
 GTCAAAAAGGCTATCGTGATCCGCCGTATCACAATTGGATGCACGCGTTTAGCGTTTCCCATTTTGTCTATCTG
 CTGTATAAAAACCTGGAGCTGACCAATTATCTGGAGGACATCGAGATCTTTGCTCTGTTTATCAGCTGTATGTGC
 CACGATCTGGATCATCGTGGTACGAATAACAGCTTTCAGGTGCCAGCAAATCTGTACTGGCGGCACTGTATTCT
 TCAGAGGGTTCCGTTATGGAGCGTCACCACTTCGCCCCAAGCAATCGCTATTCTGAACACCCATGGCTGTAACATT
 TTCGATCACTTCAGCCGTAAAGACTATCAGCGTATGCTGGATCTGATGCGCGATATTATTCTGGCTACCGATCTG
 GCCCATCACCTGCGCATTTTCAAAGACCTGCAGAAAATGGCCGAAGTCGGCTATGATCGTAACAACAAACAGCAC
 CACCGCCTGCTGCTGTGTCTGCTGATGACCAGCTGTGATCTGTGACAGACGAAAGGTTGGAAAACCACTCGT
 AAAATTGCTGAACTGATCTATAAAGAGTTCTTCTCCCAGGGAGATCTGGAAAAAGCAATGGGCAATCGTCCGATG
 GAGATGATGGACCGTGAGAAAGCCTATATTCCGGAAGTGCAGATCAGCTTTATGGAGCATATCGCCATGCCGATC
 TATAAACTGCTGCAAGACCTGTTTCCGAAAGCAGCCGAAGTGTATGAGCGTGTTCCTCTAATGGTGAGCACTGG
 ACCAAAGTTTTACACAAATTCACCTATCCGTGGGATTCCGAGCAATAACAGTCTGGACTTCCTGGATGAGGAGTAT
 GAAGTTCCTGACCTGGACGGTACACGTGCTCCGATTAACGGTTGCTGTAGCCTGGATGCCGAAATCACCATCAC
 CATCACTGAAAGCTT

LAPD_EGFP in pEGFP-N1 – humanisiert

Aminosäurereste

MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSLNAATFLGQEPTVLRGQTLA
 ALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAGHLSLTVHRVGELLILEFEPTEAWDSTGPHALRNAMFALESA
 PNLRALAEVATQTVRELTFDRVMLYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRHLLRLTA
 DTRAAAVPLDPVLNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLNRNMGVSSLSVSVVVGGLWGLIACHHQTPYVLPDP
 LRTTLEYLGRLLSLQVQVKEAADVAEFRQSLREHHARVALAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRFEGR
 WQTLGEVPPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEGWSECLVWLRPELRLEVA
 WGGATPDQAKDDLGRHSFDTYLEEKRGYAEFWHPGEIEEAQDLRDLTGALGERLKKVNEAQYRSHLANEMMY
 HMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMLQDMNFINNYKIDCPTLARFCIMVKK
 GYRDPYPYHNWMAFVSVSHFCYLLYKNLELTNYLEDIEIFALFISCMCHDLDRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEG
 SVMERHHFAQAIAILNTHGCNIFDHFSRKDYQRMMLDRDIIILATDLAHLRLIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHHLR
 LLCLLMTSCDLSQTKGWKTTTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIPELQISFMEHIAMPIYKL
 LQDLFPKAAELYERVASNGEHWTKVSHKFTIRGIPSNNSLDFLDEEYEVPLDGTTRAPINGCCSLDAEKLRIQS
 TVPRARDPPVATMVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGELEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPPTLV
 TLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL
 GHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPN
 EKRDMVLLEFVTAAGITLGMDELYK

DNA (Fusionsschnittstelle \triangle Afe/)

GCTAGCATGAGCAGGGACCCCTGCCCTTCTTCCACCCCTGTATCTGGGCGGACCCGAGATCACCACCGAGAAC
 TGCGAGAGAGAGCCCATCCACATCCCCGGCAGCATTCAGCCTCATGGCGCCCTGCTGACAGCCGATGGACACTCT
 GGCGAGGTGCTGCAGATGAGCCTGAACGCCGCCACCTTTCTGGGCCAGGAACCCACAGTGCTGAGAGGCCAGACA
 CTGGCCGCTCTGCTGCCTGAACAGTGGCCTGCTCTGCAGGCTGCTCTGCCTCCTGGATGTCCTGACGCCCTGCAG
 TACAGAGCCACCCTGGATTGGCCTGCCGCCGGACACCTGTCTCTGACCGTGCACAGAGTGGGCGAGCTGCTGATC
 CTGGAATTCGAGCCTACCGAGGCCTGGGACAGCACAGGACCTCACGCCCTGAGAAACGCCATGTTTCGCCCTGGAA
 AGCGCCCCAACCTGAGAGCCCTGGCCGAAGTGGCTACACAGACCGTGCGGGAAGTACCGGCTTCGACAGAGTG
 ATGCTGTACAAGTTCGCCCCGACGCCACCGGCGAAGTGATTGCCGAAGCCAGAAGAGAGGGGCTGCACGCTTTT
 CTGGGACACAGATTCGCCGCCAGCGACATCCCTGCCAGGCCAGAGCCCTGTACACCGGCATCTGCTGAGACTG
 ACCGCCGACACAAGAGCCGCTGCCGTGCCTCTGGACCCCGTGCTGAATCCTCAGACCAACGCCCTTACACCTCTG
 GGAGGCGCTGTGCTGAGGGCTACCAGCCCTATGCACATGCAGTACCTGCGGAACATGGGCGTGGGCAGCAGCCTG
 TCTGTGTCCGTGGTTCGTGGGAGGACAGCTGTGGGGACTGATCGCCTGTACCACCAGACCCCCCTACGTGCTGCC

CCCGATCTGAGAACCACACTGGAATACCTGGGCCGGCTGCTGAGCCTGCAGGTGCAAGTGAAAGAGGCCGCCGAT
 GTGGCCGCCTTCAGACAGAGCCTGAGAGAACCACCATGCCCCGGGTGGCACTGGCTGCCGCCCATTTCTCTGAGCCCT
 CACGACACCCTGAGCGACCCTGCTCTGGATCTGCTGGGCCTGATGAGAGCCGGCGGACTGATCCTGAGATTTGAG
 GGCAGATGGCAGACCCTGGGAGAGGTGCCACCAGCCCCTGCTGTGGATGCTCTGCTGGCTTGGCTGGAAACACAG
 CCAGGCGCCCTGGTGCAGACAGATGCACTGGGCCAGCTGTGGCCAGCAGGCGCTGATCTGGCTCCTTCTGCAGCT
 GGACTGCTGGCTATCTCTGTGGCGAGGGGTGGAGCGAGTGTCTCGTGTGGCTGAGGCCCCGAGCTGAGGCTGGAA
 GTGGCTTGGGGCGGAGCCACACCAGACCAGGCCAAGGATGATCTGGGCCCCAGACACAGCTTCGACACCTACCTG
 GAAGAGAAGCGGGGCTACGCCGAGCCTTGGCACCTTGGCGAAATTGAGGAAGCCCAGGACCTGCGGGATACCTTG
 ACAGGCGCACTGGGAGAGCGCTTGAAAAAGTGAATGAGGCTCAGTATCGCAGCCACCTGGCCAATGAGATGATG
 ATGTACCACATGAAGGTCTCCGACGATGAGTATACCAAATTTCTCCATGATGGGATCCAGCCTGTGGCTGCCATT
 GACTCCAATTTTGAAGTTTTACCTATACCCCTCGTTCCCTGCCCCGAGGATGACACGTCCATGGCCATCCTGAGC
 ATGCTGCAGGACATGAATTTTATCAACAACCTACAAAATTGACTGCCCCGACCCTGGCCCCGGTTCTGTTTTGATGGTG
 AAGAAGGGCTACCGGGATCCCCCTACCACAACCTGGATGCACGCCTTTTCTGTCTCCCACTTCTGCTACCTGCTC
 TACAAGAACCTGGAGCTCACCACCTACCTCGAGGACATCGAGATCTTTGCCTTGTTTATTTCTGCTGATGTGTCAT
 GACCTGGACCACAGAGGCACAAACAACCTCTTTCCAGGTGGCCTCGAAATCTGTGCTGGCTGCGCTCTACAGCTCT
 GAGGGCTCCGTCATGGAGAGGCACCACTTTGCTCAGGCCATTGCCATCCTCAACACCCACGGCTGCAACATCTTT
 GATCATTTTCTCCCGGAAGGACTATCAGCGCATGCTGGATCTGATGCGGGACATCATCTTGGCCACAGACCTGGCC
 CACCATCTCCGCATCTTCAAGGACCTCCAGAAGATGGCTGAGGTGGGCTACGACCGAAACAACAAGCAGCACCAC
 AGACTTCTCCTCTGCCTCCTCATGACCTCCTGTGACCTCTCTGACCAGACCAAGGGCTGGAAGACTACGAGAAAG
 ATCGCGGAGCTGATCTACAAAGAATTCTTCTCCCAGGGAGACCTGGAGAAGGCCATGGGCAACAGGCCGATGGAG
 ATGATGGACCGGGAGAAGGCCTATATCCCTGAGCTGCAAATCAGCTTCATGGAGCACATTGCAATGCCCATCTAC
 AAGCTGTTGCAGGACCTGTTCCCCAAAGCGGCAGAGCTGTATGAGCGCGTGGCCTCCAACGGTGAGCACTGGACC
 AAGGTGTCCACAAGTTCACCATCCGCGGCATCCCAAGTAACAACCTCGCTGGACTTCCTGGATGAGGAGTACGAG
 GTGCCTGATCTGGATGGCACTAGGGCCCCCATCAATGGCTGCTGCAGCCTTGATGCTGAGAAGCTTCGAATTCTG
 CAGTCGACGGTACCGCGGGCCCCGGGATCCACCGGTGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGG
 GTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGC
 GATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCTC
 GTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAG
 TCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
 GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAAC
 ATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACCTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC
 ATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC
 ACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
 CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAG
 CTGTACAAGTAAAGCGGCCGC

LAPD minus EGFP in pEGFP-N1– humanisiert

Aminosäurereste

MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSLNAATFLGQEPTVLRGQTLA
 ALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAGHLSLTVHRVGELLILEFEPTAWDSTGPHALRNAMFALESA
 PNLRALAEVATQTVRELTFGDRVMYKFPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRHLLRLTA
 DTRAAAVPLDPVLNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMVGSSLSVSVVVGGLWGLIACHHQTPYVLPD
 LRTTLEYLGRLLSLQVQVKEAADVAEFRQSLREHARVALAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRFEGR
 WQTLGEVPPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLPSAAGLLAISVGEGWSECLVWLRPELRLLEVA
 WGGATPDQAKDDLGPRLSFDTYLEEKRGYAEWPHPGEIEEAQDLRDLTGALGERLKKVNEAQYRSHLANEMMY
 HMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMQDMNFINNYKIDCPTLARFCIMVKK
 GYRDPPIYHNWMAFVSVSHFCYLLYKNLELTNYLEDIEIFALFISCMCHDLDRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEG
 SVMERHHFAQAIAILNTHGCNIFDHFSRKDYQRMFLMRDII LATDLAHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHRL
 LLCLLMTSCDLSQTKGWKTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIPELQISFMEHIAMPYKLL
 LQDLFPKAAELYERVASNGEHWTKVSHKFTIRGIPSNNSLDFLDEEYVDPDLGTRAPINGCCSLDAE

DNA (Fusionsschnittstelle \triangle AfeI)

GCTAGCATGAGCAGGGACCCCTGCCCTTCTTCCACCCCTGTATCTGGGCGGACCCGAGATCACCACCGAGAAC
 TGGGAGAGAGAGCCCATCCACATCCCCGGCAGCATTCAGCCTCATGGCGCCCTGCTGACAGCCGATGGACACTCT
 GGCGAGGTGCTGCAGATGAGCCTGAACGCCGCCACCTTTCTGGGCCAGGAACCCACAGTGCTGAGAGGCCAGACA
 CTGGCCGCTCTGCTGCCTGAACAGTGGCCTGCTCTGCAGGCTGCTCTGCCTCCTGGATGTCCTGACGCCCTGCAG
 TACAGAGCCACCCTGGATTGGCCTGCCGCCGGACACCTGTCTCTGACCGTGACAGAGTGGGCGAGCTGCTGATC
 CTGGAATTCGAGCCTACCGAGGCCTGGGACAGCACAGGACCTCACGCCCTGAGAAACGCCATGTTTCGCCCTGGAA
 AGCGCCCCAACCTGAGAGCCCTGGCCGAAGTGGCTACACAGACCGTGCGGGAAGTACCGGCTTCGACAGAGTG
 ATGCTGTACAAGTTCGCCCCGACGCCACCGGCGAAGTGATTGCCGAAGCCAGAAGAGAGGGCCTGCACGCTTTT
 CTGGGACACAGATTCCCCGCCAGCGACATCCCTGCCAGGCCAGAGCCCTGTACACCCGGCATCTGCTGAGACTG
 ACCGCCGACACAAGAGCCGCTGCCGTGCCTCTGGACCCCGTGCTGAATCCTCAGACCAACGCCCTTACACCTCTG
 GGAGGCGCTGTGCTGAGGGCTACCAGCCCTATGCACATGCAGTACCTGCGGAACATGGGCGTGGGCAGCAGCCTG
 TCTGTGTCCGTGGTTCGTGGGAGGACAGCTGTGGGGACTGATCGCCTGTACCACCAGACCCCCCTACGTGCTGCC
 CCGATCTGAGAACCACACTGGAATACCTGGGCCGGCTGCTGAGCCTGCAGGTGCAAGTGAAAGAGGCCGCCGAT
 GTGGCCGCCTTCAGACAGAGCCTGAGAGAACACCATGCCCGGGTGGCACTGGCTGCCGCCCATTTCTCTGAGCCCT
 CACGACACCCTGAGCGACCCTGCTCTGGATCTGCTGGGCCCTGATGAGAGCCGGCGGACTGATCCTGAGATTTGAG
 GGCAGATGGCAGACCCTGGGAGAGGTGCCACCAGCCCCCTGCTGTGGATGCTCTGCTGGCTTGGCTGGAAACACAG
 CCAGGCGCCCTGGTGCAGACAGATGCACTGGGCCAGCTGTGGCCAGCAGGCGCTGATCTGGCTCCTTCTGCAGCT
 GGACTGCTGGCTATCTCTGTGGGCGAGGGGTGGAGCGAGTGTCTCGTGTGGCTGAGGCCCCGAGCTGAGGCTGGAA
 GTGGCTTGGGGCGGAGCCACACCAGACCAGGCCAAGGATGATCTGGGCCCCAGACACAGCTTCGACACCTACCTG
 GAAGAGAAGCGGGGCTACGCCGAGCCTTGGCACCCCTGGCGAAATTGAGGAAGCCAGGACCTGCGGGATACCTTG
 ACAGGCGCACTGGGAGAGCGCTTGAAAAAGTGAATGAGGCTCAGTATCGCAGCCACCTGGCCAATGAGATGATG
 ATGTACCACATGAAGGTCTCCGACGATGAGTATACCAAACCTTCTCCATGATGGGATCCAGCCTGTGGCTGCCATT
 GACTCCAATTTTGCAAGTTTACCTATACCCCTCGTTCCCTGCCCGAGGATGACACGTCCATGGCCATCTTGAGC
 ATGCTGCAGGACATGAATTTTCATCAACAACCTACAAAATTGACTGCCCGACCCTGGCCCCGGTTCTGTTTGATGGTG
 AAGAAGGGCTACCGGGATCCCCCTACCACAACCTGGATGCACGCCTTTTCTGTCTCCCACTTCTGCTACCTGCTC
 TACAAGAACCTGGAGCTACCAACTACCTCGAGGACATCGAGATCTTTGCCTTGTTTATTTCTGTCATGTGTCAT
 GACCTGGACCACAGAGGCACAAACAACCTCTTCCAGGTGGCCTCGAAATCTGTGCTGGCTGCGCTCTACAGCTCT
 GAGGGCTCCGTTCATGGAGAGGCACCACTTTGCTCAGGCCATTGCCATCCTCAACACCCACGGCTGCAACATCTTT
 GATCATTCTCTCCGGAAGGACTATCAGCGCATGCTGGATCTGATGCGGGACATCATCTTGGCCACAGACCTGGCC
 CACCATCTCCGCATCTTCAAGGACCTCCAGAAGATGGCTGAGGTGGGCTACGACCGAAACAACAAGCAGCACCAC
 AGACTTCTCCTCTGCCTCCTCATGACCTCCTGTGACCTCTCTGACCAGACCAAGGGCTGGAAGACTACGAGAAAG
 ATCGCGGAGCTGATCTACAAAGAATTCTTCTCCCAGGGAGACCTGGAGAAGGCCATGGGCAACAGGCCGATGGAG
 ATGATGGACCGGGAGAAGGCCTATATCCCTGAGCTGCAAATCAGCTTCATGGAGCACATTGCAATGCCCATCTAC
 AAGCTGTTGCAGGACCTGTTCCCCAAAGCGGCAGAGCTGTATGAGCGCGTGGCCTCCAACGGTGAGCACTGGACC
 AAGGTGTCCACAAGTTCACCATCCGCGGCATCCCAAGTAACAACCTCGCTGGACTTCTGGATGAGGAGTACGAG
 GTGCCTGATCTGGATGGCACTAGGGCCCCCATCAATGGCTGCTGCAGCCTTGATGCTGAGTAAGCGGCCGC

LAPD in pGEM-HE – humanisiert

Aminosäurereste

MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSLNAATFLGQEPTVLRGQTLA
 ALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAGHLSLTVHRVGELLILEFEPTAWDSTGPHALRNAMFALESA
 PNLRALAEVATQTVRELTFGDRVMYKFAPDATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRHLLRLTA
 DTRAAAVPLDPVLNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSSLSVSVVVGGLWGLIACHHQTPYVLPDP
 LRTTLEYLGRLLSLQVQVKEAADVAAFRQSLREHHARVALAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRFEGR
 WQTLGEVPPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEGWSECLVWLRLPELRLEVA
 WGGATPDQAKDDLGRHSFDTYLEEKRGYAEPWHPGEIEEAQDLRDTLTGALGERLKKVNEAQYRSHLANEMMY
 HMKVSDDEYTKLLHDGIQPVAAIDSNFASFTYTPRSLPEDDTSMAILSMQLDMNFINNYKIDCPTLARFCIMVKK
 GYRDPPIYHNWMHAFSVSHFCYLLYKNLELTNYLEDIEIFALFISCMCHDLDRGTNNSFQVASKSVLAALYSSEG
 SVMERHHFAQAIAILNTHGCNIFDHFSRKDYQRMOLDLRDII LATDLAHLRIFKDLQKMAEVGYDRNNKQHRL
 LLCLLMTSCDLSQTKGWKTRKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIPELQISFMEHIAMPIYKL
 LQDLFPKAAELYERVASNGEHWTKVSHKFTIRGIPSNNSLDFLDEEYVDPDLGTRAPINGCCSLDAERTSKS

DNA

CCCGGTATGAGCAGGGACCCCTGCCCTTCTTCCACCCCTGTATCTGGGCGGACCCGAGATCACACCGAGAAC
 TGCAGAGAGAGCCCATCCACATCCCCGGCAGCATTCAGCCTCATGGCGCCCTGCTGACAGCCGATGGACACTCT
 GGCAGAGTGCTGCAGATGAGCCTGAACGCCGCCACCTTTCTGGGCCAGGAACCCACAGTGCTGAGAGGCCAGACA
 CTGGCCGCTCTGCTGCCTGAACAGTGCCCTGCTCTGCAGGCTGCTCTGCCTCCTGGATGTCTGACGCCCTGCAG
 TACAGAGCCACCCTGGATTGGCCTGCCGCCGGACACCTGTCTCTGACCGTGACAGAGTGCCGAGCTGCTGATC
 CTGGAATTCGAGCCTACCGAGGCCTGGGACAGCACAGGACCTCACGCCCTGAGAAACGCCATGTTTCGCCCTGGAA
 AGCGCCCCAACCTGAGAGCCCTGGCCGAAGTGGCTACACAGACCGTGCGGGAAGTGAACCGGCTTCGACAGAGTG
 ATGCTGTACAAGTTCGCCCCGACGCCACCGCGAAGTGATTGCCGAAGCCAGAAGAGAGGGCCTGCACGCTTTT
 CTGGGACACAGATTCCCCGCCAGCGACATCCCTGCCAGGCCAGAGCCCTGTACACCGGCATCTGCTGAGACTG
 ACCGCCGACACAAGAGCCGCTGCCGTGCCTCTGGACCCCGTGCTGAATCCTCAGACCAACGCCCTACACCTCTG
 GGAGGCGCTGTGCTGAGGGCTACCAGCCCTATGCACATGCAGTACCTGCGGAACATGGGCGTGCCGAGCAGCCTG
 TCTGTGTCCGTGGTTCGTGGGAGGACAGCTGTGGGGACTGATCGCCTGTACACCACAGACCCCCCTACGTGCTGCC
 CCGATCTGAGAACCACACTGGAATACCTGGGCCGCTGCTGAGCCTGCAGGTGCAAGTGAAAGAGGCCGCCGAT
 GTGGCCGCTTCAGACAGAGCCTGAGAGAACCATGCCCGGGTGCCACTGGCTGCCGCCCATCTCTGAGCCCT
 CACGACACCCTGAGCGACCCTGCTCTGGATCTGCTGGCCCTGATGAGAGCCGGCGGACTGATCCTGAGATTTGAG
 GGCAGATGGCAGACCCTGGGAGAGGTGCCACCAGCCCTGCTGTGGATGCTCTGCTGGCTTGGCTGGAAACACAG
 CCAGGCGCCCTGGTGCAGACAGATGCACTGGGCCAGCTGTGGCCAGCAGGCGCTGATCTGGCTCCTTCTGCAGCT
 GGACTGCTGGCTATCTCTGTGGGCGAGGGGTGGAGCGAGTGTCTCGTGTGGCTGAGGCCCCGAGCTGAGGCTGGAA
 GTGGCTTGGGGCGGAGCCACACCAGACAGGCCAAGGATGATCTGGGCCCCAGACACAGCTTCGACACCTACCTG
 GAAGAGAAGCGGGGCTACGCCGAGCCTTGGCACCTTGGCGAAATTGAGGAAGCCAGGACCTGCGGGATACCTG
 ACAGGCGCACTGGGAGAGCGCTTGAAAAAGTGAATGAGGCTCAGTATCGCAGCCACCTGGCCAATGAGATGATG
 ATGTACCACATGAAGGTCTCCGACGATGAGTATACCAAACCTTCTCCATGATGGGATCCAGCCTGTGGCTGCCATT
 GACTCCAATTTTGCAAGTTTACCTATAACCCCTCGTTCCCTGCCGAGGATGACACGTCCATGGCCATCCTGAGC
 ATGCTGCAGGACATGAATTTTCAACAACCTACAAAATTGACTGCCCGACCCTGGCCCCGTTCTGTTTGTGGTG
 AAGAAGGGCTACCGGATCCCCCTACCACAACCTGGATGCACGCCTTTTCTGTCTCCCACTTCTGCTACCTGCTC
 TACAAGAACCTGGAGCTACCAACTACCTCGAGGACATCGAGATCTTTGCCTTGTTTATTTCTGTCATGTGTCAT
 GACCTGGACCACAGAGGCACAAACAACTCTTCCAGGTGGCCCTCGAAATCTGTGCTGGCTGCGCTCTACAGCTCT
 GAGGGCTCCGTATGGAGAGGCACCACTTTGCTCAGGCCATTGCCATCCTCAACACCCACGGCTGCAACATCTTT
 GATCATTTCTCCCGAAGGACTATCAGCGCATGCTGGATCTGATGCGGGACATCATCTTGGCCACAGACCTGGCC
 CACCATCTCCGCATCTTCAAGGACCTCCAGAAGATGGCTGAGGTGGGCTACGACCGAAACAACAAGCAGCACCAC
 AGACTTCTCCTCTGCCTCCTCATGACCTCCTGTGACCTCTCTGACCAGACCAAGGGCTGGAAGACTACGAGAAAG
 ATCGCGGAGCTGATCTACAAAGAATTCTTCTCCAGGGAGACCTGGAGAAGGCCATGGGCAACAGGCCGATGGAG
 ATGATGGACCGGGAGAAGGCCTATATCCCTGAGCTGCAAAATCAGCTTCATGGAGCACATTGCAATGCCCATCTAC

AAGCTGTTGCAGGACCTGTTCCCCAAAGCGGCAGAGCTGTATGAGCGCGTGGCCTCCAACGGTGAGCACTGGACC
AAGGTGTCCACAAGTTACCATCCGCGGCATCCCAAGTAACAACCTCGCTGGACTTCTGGATGAGGAGTACGAG
GTGCCTGATCTGGATGGCACTAGGGCCCCCATCAATGGCTGCTGCAGCCTTGATGCTGAGCGTACGAGCAAAAGC
TGA

PaBPD+2 in pASK43(+) – *E.-coli*-adaptiert

Aminosäurereste

MASMTSITPVTLANCEDPIHVPGAIQPHGALVTLRADGMVLAASENIQALLGFVASPGSYLTQEQVGPEVLRML
EEGLTGNGPWSNSVETRIGEHLFDVIGHSYKEVFYLEFEIRTADTSLITSFTLNAQRILIAQVQLHNDTASLLSNV
TDELRRMTGYDRVMAYRFRHDDSGEVVAESRREDLESYLGQRYPASDIPAQARRLYIQNPRLIADVAYTPMRVF
PALNPETNESFDLSYSVLRVSPHCEYLTNMGVRASMSISIVVGGKLWGLFSCHHMSPKLIYPVVRMSFQIFSQ
VCSAIVERLEQGRIAEELLRVSTERRLALARRADDLFGALAHPPDDGIAALIPCDGALVMLGGRTLSIRGDFER
QAGNVLQRLQRPDIYHTDNWPQSPEDSPDGGDCCGVLAIRFHRQESGWIFWFRHEEVHRIRWGGKPEKLLTI
GPSGPRLTPRGSFEAWEEVVRGHSTPWSETDLAIAEKLRDLMLCLNHALYKKGYPYHNMHAFSVSHFCY
LLYKNLELTNYLEDIEIFALFISCMCHDLDRHGTNNSFQVASKSVLAALYSSEGSMERHHFAQAIAILNTHGCN
IFDHFSRKDYQRMIDLMDIILATDLAHLRLIFKDLQKMAEVGYDRNNKHRLLLCLLMTSCDLSDQTKGWKTT
RKIAELIYKEFFSQGDLEKAMGNRPMEMMDREKAYIPELQISFMEHIAMPIYKLLQDLFPKAAELYERVASNGEH
WTKVSHKFTIRGIPSNNSLDFLDEEYEPDLDGTRAPINGCCSLDAEHHHHHH

DNA (Fusionsschnittstelle \triangle *KspAI*)

GCTAGCATGACGAGCATCACCCGGTTACCCTGGCGAACTGCGAGGACGAACCCATCCACGTGCCTGGCGCGATC
CAGCCGCACGGGGCGCTGGTCACCCTGCGCGCGGACGGCATGGTCCTCGCGGCAAGCGAGAACATCCAGGCGCTA
CTGGGGTTCGTGCGCTCGCCGGGTTCTACCTGACGCAGGAGCAGGTGGGGCCGGAGGTCTCGCATGCTCGAA
GAGGGACTGACCGGCAACGGCCCATGGTCGAACAGCGTCGAGACGCGGATCGGCGAACACCTGTTGACGTGATC
GGCCACAGCTACAAGGAAGTGTCTACCTGGAGTTGAGATCCGCACCGCGGACACGCTGTGATCACCTCCTTC
ACCCTCAACGCCCAGCGCATCATCGCCAGGTCCAGTTGCACAACGACACCGCCAGCTGCTCAGCAACGTCACC
GACGAACTGCGCCGGATGACCGGCTACGACCGGGTGATGGCCTACCGTTTCCGCCATGACGACTCCGGCGAGGTG
GTCGCGGAGAGCCGTGCGGAAGACCTCGAAAGCTACCTGGGGCAACGCTACCCGGCCTCGGACATCCCGGCCAG
GCGCGTCGCTGTACATCCAGAACCCGATCAGGCTGATCGCCGACGTGGCCTATACCGCGATGCGCGTGTTCCTCC
GCGCTGAACCCGGAGACCAACGAATCGTTCGATCTCAGCTACAGCGTGTGCGCAGCGTTTCGCCGATCCACTGC
GAATACCTGACCAACATGGGCGTGCGCGCCTCGATGAGCATCTCCATCGTGGTGGCGGCAAGCTCTGGGGACTG
TTCTCCTGCCATCACATGTGCCCCAACTGATTCCCTACCCGGTGCGCATGTGTTCCAGATCTTCTCCAGGTC
TGCAGCGCCATCGTCGAGCGCCTGGAGCAGGGCGTATCGCCGAACTGCTGCGCGTGTCCACCGAGCGCAGGCTG
GCCCTGGCTCGCCGCGCGCGGGACGCCGACGACCTGTTTCGGCGCACTGGCCCCACCCGGACGATGGCATCGCCGA
CTGATTCCCTGCGACGGCGCCCTGGTCATGCTCGGCGGCGCCACCCCTGAGCATCCCGGGCGACTTCGAGCGCCAG
GCCGGGAATGTCTGCAACGCCTGCAGCGCGACCCGGAACGGGACATCTACCACACCGACAACCTGGCCGAGCCC
AGCGAGGACTCTCCGACGGCGGCGACTGCTGCGGTGTGCTGGCGATCCGTTTCCACCGCCAGGAATCGGGCTGG
ATCTTCTGGTTCCGCCACGAGGAAGTGACCGCATCCGCTGGGGCGGCAAGCCGAAAAGCTGTTGACCATCGGC
CCCTCCGGCCCGCGGCTGACCCGCGCGGCTCGTTGAGGCCTGGGAGGAAGTGGTCCGCGGCCACTCCACGCCC
TGGAGCGAAACCGACCTGGCGATCGCCGAAAAGCTGCGCCTGGACCTGATGGAAGTGTGCTCAACCATGCGCTG
TACAAAAAAGTAAACGAGGCCAGTATCGCTCTCATCTGGCAAACGAAATGATGATGTATCACATGAAAGTGTCC
GACGACGAGTATACCAACTGCTGCACGATGGCATTCAACCTGTTGCTGCTATTGACTCCAACCTTCGCTTCCTTC
ACCTATACACCACGTTCTCTGCCGGAGGATGACACCTCTATGGCTATCCTGAGCATGCTGCAAGACATGAACCTT
ATCAACAACTATAAAATCGACTGCCGACCCCTGGCTCGCTTCTGTCTGATGGTCAAAAAAGGCTATCGTGATCCG
CCGTATCACAATTGGATGCACGCGTTTAGCGTTTCCATTTTTGCTATCTGCTGTATAAAAACTGGAGCTGACC
AATTATCTGGAGGACATCGAGATCTTTGCTCTGTTTATCAGCTGTATGTGCCACGATCTGGATCATCGTGGTACG
AATAACAGCTTTTCAGGTGCGCAGCAAATCTGTACTGGCGGCACTGTATTCTTCAGAGGGTTCCGTTATGGAGCGT

CACCACTTCGCCCAAGCAATCGCTATTCTGAACACCCATGGCTGTAACATTTTCGATCACTTCAGCCGTAAAGAC
 TATCAGCGTATGCTGGATCTGATGCGCGATATTATTCTGGCTACCGATCTGGCCCATCACCTGCGCATTTTCAA
 GACCTGCAGAAAATGGCCGAAGTCGGCTATGATCGTAACAACAAACAGCACCACCGCTGCTGCTGTGTCTGCTG
 ATGACCAGCTGTGATCTGTCAGACCAGACGAAAGGTTGGAAAACCACTCGTAAAATTGCTGAACTGATCTATAAA
 GAGTTCTTCTCCAGGGAGATCTGGAAAAAGCAATGGGCAATCGTCCGATGGAGATGATGGACCGTGAGAAAACC
 TATATTCCGGAAGTGCAGATCAGCTTTATGGAGCATATCGCCATGCCGATCTATAAACTGCTGCAAGACCTGTTT
 CCGAAAGCAGCCGAAGTGTATGAGCGTGTTGCCTCTAATGGTGAGCACTGGACCAAAGTTTACACAAAATTCAC
 ATCCGTGGGATTCCGAGCAATAACAGTCTGGACTTCCTGGATGAGGAGTATGAAGTTCCTGACCTGGACGGTACA
 CGTGCTCCGATTAACGGTTGCTGTAGCCTGGATGCCGAACATCACCATCACCATCACTGAAAGCTT

DrBPhy_6x-N-His in pET28c(+)

Aminosäurereste

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMS
 LNAATFLGQEP TVLRGQTLAALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAGHLSLTVHRVGELLILEFEPT
 AWDSTGPHALRNAMFALESAPNLRALAEVATQTVRELTFGDRVMYKFAFDPATGEVIAEARREGLHAF LGH RFP
 SDIPAQARALYTRHLLRLTADTRAAVPLDPVLNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVSSLSVSVVVG
 GQLWGLIACHHQTPYVLPDLRTTLEYLGRLLSLQVQVKEADVAAFRQSLREHHARVALAAHSLSPHDTLSDP
 ALDLLGLMRAGGLILRFEGRWQTLGEVPPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISV
 GEGWSECLVWLRLPELRLEVAWGGATPDQAKDDLGRHSFDTYLEEKRGYAE PWH PGEIEEAQDLRDTLTGALGER
 LSVIRDLNRALTQSNAEWRQYGFVISHMQEPVRLISQFAELLTRQPRADGSPDSPQTERITGFLRLRSLRS
 LTQDLHTYTALLSAPPPVRRPTPLGRVVDVLDLQDLEPRIADTGASIEVAPELPVIAADAGLLRDL LHLIGNALT
 FGGPEPRIAVRTERQGAGWSIAVSDQGAGIAPEYQERIFLLFQRLGSLDEALGNGLGLPLCRKIAELHGGLTVE
 SAPGEGSTFRCLPDAGPLPGAADA

DNA (NdeI/SalI)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAGCCGGGACCCG
 TTGCCCTTTTTTCCACCGCTTTACCTTGGTGGCCCGGAAATTACCACCGAGAACTGCGAGCGCGAGCCGATTCAT
 ATTCCCGGCAGCATCCAGCCGCACGGCGCCCTGCTCACTGCCGACGGGCACAGCGGCGAGGTGCTCCAGATGAGC
 CTCAACGCGGCCACTTTTTCTGGGACAGGAACCCACAGTGCTGCGCGGACAGACCCTCGCCGCACTGCTGCCCAG
 CAGTGGCCCGCGCTGCAAGCGGCCCTGCCCCCGGCTGCCCCGACGCCCTGCAATACCGCGCAACGCTGGACTGG
 CCTGCCGCGCGGCACCTTTCTGCTGACGGTGACCGGGTCGGCGAGTTGCTGATTCTGGAATTCGAGCCGACGGAG
 GCCTGGGACAGCACCAGGCGCGACGCGCTGCGCAACGCGATGTTGCGGCTCGAAAGTGCCCCAACCTGCGGGCG
 CTGGCCGAGGTGGCGACCCAGACGGTCCGCGAGCTGACGGGCTTTGACCGGGTGATGCTCTACAAATTTGCCCC
 GACGCCACCGGCGAAGTGATTGCCGAGGCCCCGCGTGAGGGGCTGCACGCCTTTCTGGGCCACCGTTTTCCCGCG
 TCGGACATTCCGGCGCAGGCCCGCGCGCTCTACACCCGGCACCTGCTGCGCCTGACCGCCGACACCCGCGCCGCC
 GCCGTGCCGCTCGATCCCGTCTCAACCCGACAGCAATGCGCCACCCCGCTGGGCGGCGCGGTGCTGCGCGCC
 ACCTCGCCCATGCACATGCAGTACCTGCGGAACATGGGCGTCGGGTGAGCCTGTGCGGTGTCGGTGGTGGTGGC
 GGCCAGCTCTGGGGCTGATCGCCTGCCACCACAGACGCCCTACGTGTTGCCGCCCCGACCTGCGAACCACGCTC
 GAATACCTGGGCGCTTGCTGAGCCTGCAAGTTTCAAGTCAAGGAAGCGGCGGACGTGGCGGCCTTTTCGCCAGAGC
 CTGCGGGAGCACCACGCGCGGGTGGCCCTGCGGGCGGCGCACTCGCTCTCGCCGACGACACCCCTCAGTGACCCG
 GCGCTTGACCTGCTGGGCCTGATGCGGGCGGGGGCCTGATTCTGCGTTTTGAGGGCGCGCTGGCAGACGTTGGGT
 GAAGTGCCGCTGCCCCGGCGGTGGACGCGCTGCTGGCGTGGCTCGAAACCCAGCCGGGCGCCCTGGTCCAGACC
 GACGCGCTGGGCCAACTGTGGCCCCGCGGCGCGATCTCGCCCCAGCGCAGCGGGCTGCTCGCCATCAGCGTG
 GGCGAGGGCTGGTCGGAGTGCCTCGTCTGGCTGCGGGCCGAAGTGGGCTGGAGGTGCGCTGGGGCGGGGCCACT
 CCTGACCAGGCGAAAGACGACCTCGGGCCGCGCCACTCATTCGACACCTACCTCGAAGAAAAACGCGGCTACGCC
 GAGCCCTGGCATCCCGGCGAAATCGAGGAGGCGCAGGATCTACGTGACACATTGACCGGGGCGCTGGGCGAGCGC
 CTGAGCGTGATTCTGACCTCAACCGGGCGCTCACACAGTCGAACGCCGAGTGGCGGCAGTACGGCTTCGTTATC
 AGCCACCACATGCAGGAGCCGGTGGGCTCATCTCGAGTTGCGCGAGTTGCTGACGCGCCAGCCCCGCGCCAG

GACGGGTCTCCGACTCTCCGCAGACCGAGCGCATCACCGGCTTTCTGCTGCGCGAAACGTCGCGCCTGCGCAGC
CTGACGCAAGACCTCCACACCTACACCGCGCTGCTCTCGGCACCGCCGCGGTGCGCCGCCCCACGCCGTGGGC
CGCGTGGTGGACGATGTGCTGCAAGACCTCGAACCCCGCATTGCCGACACCGGAGCGAGCATCGAGGTGGCGCCC
GAGTTGCCCCGTCATCGCTGCCGACGCTGGCCTGCTGCGCGACCTGCTGCTGCATCTGATCGGCAACGCGCTGACG
TTTGGTGGCCCGGAGCCGCGTATTGCCGTAAGGACCGAACGGCAAGGCGCGGGTTGGTCTATCGCGGTCACTGAC
CAGGGCGCTGGCATCGCGCCGAGTATCAGGAACGAATCTTTCTGCTGTTTCAGCGGCTCGGTTTCGCTCGATGAG
GCGCTGGGCAACGGCCTGGGCTGCCGCTGTGCCGCAAGATCGCCGAACCTGCATGGCGGCACCCGTACCGTGGAG
TCCGCGCCAGGCGAGGGCAGCACCTTCCGTTGCTGGCTGCCCCGATGCTGGGCCTCTTCCGGGAGCCGCCGATGCC
TGAGTCGAC

DrBPhy_6x-C-His in pET28c(+)

Aminosäurereste

MSRDPLPFFPPLYLGGPEITTENCEREPIHIPGSIQPHGALLTADGHSGEVLQMSLNAATFLGQEPTVLRGQTLA
ALLPEQWPALQAALPPGCPDALQYRATLDWPAAGHLSLTVHRVGELLILEFEPTAWDSTGPHALRNAMFALESA
PNLRALAEVATQTVRELTFGDRVMYKFAFDPATGEVIAEARREGLHAFLGHRFPASDIPAQARALYTRHLLRLTA
DTRAAAVPLDPVLNPQTNAPTPLGGAVLRATSPMHMQYLRNMGVGSSLSVSVVVGGQLWGLIACHHQTPYVLPDP
LRTTLEYLGRLLSLQVQVKEAADVAAFRQSLREHHARVALAAHSLSPHDTLSDPALDLLGLMRAGGLILRFEGR
WQTLGEVPPAPAVDALLAWLETQPGALVQTDALGQLWPAGADLAPSAAGLLAISVGEGWSECLVWLRPELRLLEVA
WGGATPDQAKDDLGPRLSFDTYLEEKRGYAEFWHPGEIEEAQDLRDTLTGALGERLSVIRDLNRALTQSNAEWRQ
YGFVISHMQEPVRLISQFAELLTRQPRADGSPDSPQTERITGFLLRETSRLRLSLTQDLHTYTALLSAPPPVRR
PTPLGRVDDVLQDLEPRIADTGASIEVAPELPVIAADAGLLRDLHLHIGNALTGGGPEPRIAVRTERQAGAWS
IAVSDQAGIAPEYQERIFLLFQRLGSLDEALGNLGLPLCRKIAELHGGTLTVESAPGEGSTFRCLWLPDAGPLP
GAADALEHHHHHH

DNA (NcoI-BspHI/XhoI)

CCATGAGCCGGGACCCGTTGCCCTTTTTTCCACCGCTTTACCTTGGTGGCCCGGAAATTACCACCGAGAACTGCG
AGCGCGAGCCGATTATATTCCCGGCAGCATCCAGCCGCACGGCGCCCTGCTCACTGCCGACGGGCACAGCGGCG
AGGTGCTCCAGATGAGCCTCAACGCGGCCACTTTTCTGGGACAGGAACCCACAGTGCTGCGCGGACAGACCCCTCG
CCGCACTGCTGCCCAGCAGTGGCCCGCGCTGCAAGCGGCCCTGCCCCCGGCTGCCCCGACGCCCTGCAATACC
GCGCAACGCTGGACTGGCCTGCCGCGGGGACCTTTGCTGACGGTGACCGGGTGGCGAGTTGCTGATTCTGG
AATTCGAGCCGACGGAGGCCTGGGACAGCACCGGGCCGCACGCGCTGCGCAACGCGATGTTGCGCTCGAAAGTG
CCCCAACCTGCGGGCGCTGGCCGAGGTGGCGACCCAGACGGTCCGCGAGCTGACGGGCTTTGACCGGGTGATGC
TCTACAAATTTGCCCCGACGCCACCGGCGAAGTGATTGCCGAGGCCCCCGGTGAGGGGCTGCACGCCTTTCTGG
GCCACCGTTTTTCCCGCTCGGACATTCCGGCGCAGGCCCCGCGCTCTACACCCGGCACCTGCTGCGCCTGACCG
CCGACACCCGCGCCGCCGCGTCCGCTCGATCCCGTCTCAACCCGACAGCAATGCGCCCAACCCGCTGGGCG
GCGCCGTGCTGCGCGCCACCTCGCCCATGCACATGCAGTACCTGCGGAACATGGGCGTCGGGTGAGCCTGTGCG
TGTCGGTGGTGGTGGCGGCCAGCTCTGGGGCCTGATGCGCTGCCACCACCAGACGCCCTACGTGTTGCCGCCC
ACCTGCGAACCACGCTCGAATACCTGGGCGCTTGCTGAGCCTGCAAGTTCAGGTCAAGGAAGCGGCGGACGTGG
CGGCCTTTGCGCAGAGCCTGCGGGAGCACACGCGCGGGTGGCCCTGCGGGCGGCGCACTCGCTCTCGCCGCACG
ACACCTCAGTGACCCGGCGCTTGACCTGCTGGGCCTGATGCGGGCCGGGGGCTGATTCTGCGTTTCGAGGGCC
GCTGGCAGACGTTGGGTGAAGTGCCGCTGCCCCGGCGGTGGACGCGCTGCTGGCGTGGCTCGAAACCCAGCCGG
GCGCCCTGGTCCAGACCGACGCGCTGGGCCAACTGTGGCCCGCGGCGCGGATCTCGCCCCAGCGCAGCGGGCC
TGCTCGCCATCAGCGTGGGCGAGGGCTGGTCCGAGTGCCTCGTCTGGCTGCGGCCCCGAACGCGGCTGGAGGTGCG
CCTGGGGCGGGGCCACTCCTGACCAGGCGAAAGACGACCTCGGGCCGCGCCACTCATTCGACACCTACCTCGAAG
AAAAACGCGGCTACGCCGAGCCCTGGCATCCCCGGCGAAATCGAGGAGGCGCAGGATCTACGTGACACATTGACCG
GGGCGCTGGGCGAGCGCCTGAGCGTGATTCTGTGACCTCAACCGGGCGCTCACACAGTCAACGCCGAGTGGCGGC
AGTACGGCTTCGTTATCAGCCACCACATGCAGGAGCCGGTGGCGCTCATCTCGCAGTTCGCCGAGTTGCTGACGC
GCCAGCCCCGCGCCAGGACGGGTCTCCGACTCTCCGAGACCGAGCGCATCACCGGCTTTCTGCTGCGCGAAA
CGTCGCGCCTGCGCAGCCTGACGCAAGACCTCCACACCTACACCGCGCTGCTCTCGGCACCGCCCGGTGCGCC
GCCCCACGCGCTGGGCGCGTGGTGGACGATGTGCTGCAAGACCTCGAACCCCGCATTGCCGACACCGGAGCGA

GCATCGAGGTGGCGCCCGAGTTGCCCCTCATCGCTGCCGACGCTGGCCTGCTGCGCGACCTGCTGCTGCATCTGA
TCGGCAACGCGCTGACGTTTGGTGGCCCGGAGCCGCGTATTGCCGTAAGGACCGAACGGCAAGGCGGGGTGGT
CTATCGCGGTCACTGACAGGGCGCTGGCATCGCGCCCGAGTATCAGGAACGAATCTTTCTGCTGTTTCAGCGGC
TCGGTTCGCTCGATGAGGCGCTGGGCAACGGCCTGGGCTGCCGCTGTGCCGCAAGATCGCCGAAGTGCATGGCG
GCACCTGACCGTGGAGTCCGCGCCAGGCGAGGCGAGCACCTTCCGTTGCTGGCTGCCCGATGCTGGGCCTCTTC
CGGGAGCCGCCGATGCCCTCGAGCACCACCACCACCACCAC**TGA**

DrBphO in pQE81

Aminosäurereste

**MLRLMIMKLLQRETLDLHREVEALMPVMSETLTRRGYLEVLRRLQAVVAPLEAQLDALPLPDELAWPERRKAHLL
ALDLAVMGEGPSNQAPLSVPELTTLAQAFGALYVLEGATLGGQLISRHLRRTLGLSPEQGSAYFSGYGPQTGPR
WRSFGEVLEASVPAEDAAEVVAGARQTFGAFRRALQGLSEAEAVQVPEVAHA**

DNA (EcoRI/SalI)

GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGT**ATG**CTCCGACTCATGATCATGAAGCTTTTACAAAGGGAGACCCTGGAC
CTGCACCGCGAGGTCGAGGCCCTGATGCCCGTGATGAGTGAGACGCTGACCCGGCGGGGCTATCTGGAGGTGCTG
CGGCGCCTGCAAGCGGTGGTCGCGCCGCTGGAAGCACAACCTCGACGCCCTGCCGCTGCCGGACGAGCTGGCGTGG
CCCGAGCGCCGCAAGGCCCATCTGCTCGCTCTGGACCTTGCCGTAATGGGGGAAGGGCCGTCAAATCAGCAGGCG
CCACTGTCTGTGCCCAGCTGACCACTCTGGCGCAGGCCTTCGGAGCGCTTTACGTGCTTGAAGGCGCGACGCTA
GGCGGACAGCTCATCAGCCGCCATCTCAGGCGCACGCTGGGGCTAAGCCCTGAGCAGGGCAGCGCTATTTCTCC
GGCTATGGCCCCCAGACCGGCCCGCGCTGGCGCTCGTTCGGGGAAAGTGCTGGAAGCCAGCGTGCCGGCAGAAGAC
GCGGCAGAGGTCTGTGGCGGGAGCGCGGCAGACCTTCGGGGCCTTCCGCCGCGCCTTGACAGGGGCTGTCCGAAGCT
GAAGCGGTCCAAGTGCCTGAGGTGCGCCACGCAT**TGAGT**CGAC

SsHO1-Expressionskassette aus pKT270 in pRARE (NheI oder SacI)

Aminosäurereste

**MSVNLASQLREGTKKSHSMAENVGFVKCFLKGVVEKNSYRKLVGNYLFVYSAMEEEMAKFKDHPILSHIYFPELN
RKQSLEQDLQFYYSNWRQEVKISAAGQAYVDRVRQVAATAPELLVAHSYTRYLGDLGGQILKKIAQNAMNLHD
GGTAFYEFADIDDEKAFKNTYRQAMNDLPIDQATAERIVDEANDAFAMNMKMFNELEGNLIKAIGIMVFNSLTRR
RSQGSTEVLATSEG**

DNA (NheI/NheI oder SacI/SacI)

GCTAGC/GAGCTCAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAG
CGGATAACAATTTACACAGAATTCTTAAGAAGGAGATATACAT**ATG**AGTGTCAACTTAGCTTCCCAGTTGCGGG
AAGGGACGAAAAATCCCCTCCATGGCGGAGAACGTCGGCTTTGTCAAATGCTTCCTCAAGGGCGTTGTGCGAGA
AAAATTCCTACCGTAAGCTGGTTGGCAATCTCTACTTTGTCTACAGTGCCATGGAAGAGGAAATGGCAAAATTTA
AGGACCATCCCATCCTCAGCCACATTTACTTCCCCGAACCTCAACCGCAAACAAAGCCTAGAGCAAGACCTGCAAT
TCTATTACGGCTCCAATGGCGGCAAGAAGTGAAATTTCTGCCGCTGGCCAAGCCTATGTGGACCGAGTCCGGC
AAGTGGCCGCTACGGCCCCTGAATTGTTGGTGGCCCATTCCTACACCCGTTACCTGGGGGATCTTTCCGGCGGTC
AAATTCTCAAGAAAATTGCCCAAAATGCCATGAATCTCCACGATGGTGGCACAGCTTTCTATGAATTTGCCGACA
TTGATGACGAAAAGGCTTTTAAAAATACCTACCGTCAAGCTATGAATGATCTGCCCATTGACCAAGCCACCGCCG
AACGGATTGTGGATGAAGCCAATGACGCCTTTGCCATGAACATGAAATGTTCAACGAACCTGAAGGCAACCTGA
TCAAGGCGATCGGCATTATGGTGTTCACAGCCTCACCCGTCGCCGAGTCAAGGCAGCACCGAAGTTGGCCCTCG
CCACCTCCGAAGGC**TAG**ATTTACCTAGCGTGACAACCTATCGCTAGC/GAGCTC

5.4 Gensynthese und PCR-Bedingungen

5.4.1 Gensynthesen

Gensynthese pMA-T_HsPDE2A-553-941 (*SacI*-*BsrGII*/*KpnI*; Mr.°Gene) für Fusion pET28c(+)_LAPD+2 (*E. coli*-adaptiert)

GAGCTCTGTACAAAAAAGTGAACGAGGCCAGTATCGCTCTCATCTGGCAAACGAAATGATGATGTATCACATGA
AAGTGTCCGACGACGAGTATACCAAACCTGCTGCACGATGGCATTCAACCTGTTGCTGCTATTGACTCCAACCTCG
CTTCCTTCACCTATACACCACGTTCTCTGCCGGAGGATGACACCTCTATGGCTATCCTGAGCATGCTGCAAGACA
TGAACCTTTATCAACAACCTATAAAATCGACTGCCCCGACCTGGCTCGCTTCTGTCTGATGGTCAAAAAAGGCTATC
GTGATCCGCCGTATCACAATTGGATGCACGCGTTTAGCGTTTCCATTTTTGCTATCTGCTGTATAAAAAACCTGG
AGCTGACCAATTATCTGGAGGACATCGAGATCTTTGCTCTGTTTATCAGCTGTATGTGCCACGATCTGGATCATC
GTGGTACGAATAACAGCTTTTCAGGTCGCCAGCAAATCTGTACTGGCGGCACTGTATTCTTCAGAGGGTTCCGTTA
TGGAGCGTCACCACTTCGCCCCAAGCAATCGCTATTCTGAACACCCATGGCTGTAAACATTTTCGATCACTTCAGCC
GTAAAGACTATCAGCGTATGCTGGATCTGATGCGCGATATTATTCTGGCTACCGATCTGGCCCCATCACCTGCGCA
TTTTCAAAGACCTGCAGAAAATGGCCGAAGTCGGCTATGATCGTAACAACAAACAGCACCACCGCTGCTGCTGT
GTCTGCTGATGACCAGCTGTGATCTGTGACAGCAGACGAAAGGTTGGAAAACCACTCGTAAAAATTGCTGAACTGA
TCTATAAAGAGTTCTTCTCCAGGGAGATCTGGAAAAGCAATGGGCAATCGTCCGATGGAGATGATGGACCGTG
AGAAAGCCTATATTCCGGAAGTGCAGATCAGCTTTATGGAGCATATCGCCATGCCGATCTATAAACTGCTGCAAG
ACCTGTTTCCGAAAGCAGCCGAAGTGTATGAGCGTGTTCCTCTAATGGTGAGCACTGGACCAAAGTTTCACACA
AATTCATATCCGTGGGATTCCGAGCAATAACAGTCTGGACTTCCTGGATGAGGAGTATGAAGTTCTTGACCTGG
ACGGTACACGTGCTCCGATTAACGGTTGCTGTAGCCTGGATGCCGAATGAGTCGACGGTACC

Gensynthese DrBPhy-1-506 (PCD) (*NheI*/*AfeI*-*HindIII*; Geneart) für Fusion pEGFP-N1_LAPD_EGFP (humanisiert)

GCTAGCATGAGCAGGGACCCCTGCCCTTCTTCCACCCCTGTATCTGGGCGGACCCGAGATCACACCGAGAAC
TGCGAGAGAGAGCCCATCCACATCCCCGGCAGCATTGAGCCTCATGGCGCCCTGCTGACAGCCGATGGACACTCT
GGCGAGGTGCTGCAGATGAGCCTGAACGCCGCCACCTTTCTGGGCCAGGAACCCACAGTGCTGAGAGGCCAGACA
CTGGCCGCTCTGCTGCCTGAACAGTGGCCTGCTCTGCAGGCTGCTCTGCCTCCTGGATGTCTGACGCCCTGCAG
TACAGAGCCACCCTGGATTGGCCTGCCGCCGACACCTGTCTCTGACCGTGCACAGAGTGGGCGAGCTGCTGATC
CTGGAATTCGAGCCTACCGAGGCCTGGGACAGCAGGACCTCACGCCCTGAGAAACGCCATGTTTCGCCCTGGAA
AGCGCCCCCAACCTGAGAGCCCTGGCCGAAGTGGCTACACAGACCGTGCGGGAACTGACCGGCTTCGACAGAGTG
ATGCTGTACAAGTTGCCCCGACGCCACCGGCGAAGTGATTGCCGAAGCCAGAAGAGAGGGCCTGCACGCTTTT
CTGGGACACAGATTCCCCGCCAGCGACATCCCTGCCAGGCCAGAGCCCTGTACACCCGGCATCTGCTGAGACTG
ACCGCCGACACAAGAGCCGCTGCCGTGCCTCTGGACCCCGTGTGAATCCTCAGACCAACGCCCTACACCTCTG
GGAGGCGCTGTGCTGAGGGCTACCAGCCCTATGCACATGCAGTACCTGCGGAACATGGGCGTGGGCGAGCAGCCTG
TCTGTGTCCGTGGTCTGTTGGGAGGACAGCTGTGGGGACTGATCGCCTGTACACACAGACCCCTACGTGCTGCCC
CCCGATCTGAGAACCACACTGGAATACCTGGGCCGGCTGCTGAGCCTGCAGGTGCAAGTGAAAGAGGCCGCCGAT
GTGGCCGCCTTCAGACAGAGCCTGAGAGAACACCATGCCCGGGTGGCACTGGCTGCCGCCCATTTCTCTGAGCCCT
CACGACACCCTGAGCGACCCTGCTCTGGATCTGCTGGGCCTGATGAGAGCCGGCGGACTGATCCTGAGATTTGAG
GGCAGATGGCAGACCCTGGGAGAGGTGCCACCAGCCCTGCTGTGGATGCTCTGCTGGCTGGCTGGAAACACAG
CCAGGCGCCCTGGTGCAGACAGATGCACTGGGCCAGCTGTGGCCAGCAGGCGCTGATCTGGCTCCTTCTGCAGCT
GGACTGCTGGCTATCTCTGTGGGCGAGGGGTGGAGCGAGTGTCTCGTGTGGCTGAGGCCCGAGCTGAGGCTGGAA
GTGGCTTGGGGCGGAGCCACACCAGACAGGCCAAGGATGATCTGGGCCCCAGACACAGCTTCGACACCTACCTG
GAAGAGAAGCGGGGCTACGCCGAGCCTTGGCACCCCTGGCGAAATTGAGGAAGCCAGGACCTGCGGGATACCCCTG
ACAGGCGCACTGGGAGAGCGCTTGACCAAGCTT

5.4.2 Klonierungen

pET28c(+)_DrBPhy-1-506 (PCD)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	DrBPhy 1 <i>NdeI</i> fw	CCACAACAT <u>ATG</u> AGCCGGGACCCGTTGCC
Rückwärtsprimer	DrBPhy 506 <i>Sall</i> rv	GTGTTGTCGACT <u>TCA</u> CAGGCGCTCGCCCAGCG
Template	Genomische DNA aus <i>Deinococcus radiodurans</i> (Typstamm DSM 20539)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO GC-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	
3. Annealing	72 °C	60 s	35	
4. Extension	72 °C	45 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pET28c(+)_DrBPhy_6x-N-His

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	DrBPhy 1 <i>NdeI</i> fw	CCACAACAT <u>ATG</u> AGCCGGGACCCGTTGCC
Rückwärtsprimer	DrBPhy 755 <i>Sall</i> rv	GTGTTGTCGACT <u>TCA</u> GGCATCGGCGGCTC
Template	Genomische DNA aus <i>Deinococcus radiodurans</i> (Typstamm DSM 20539)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO GC-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	
3. Annealing	72 °C	60 s	35	
4. Extension	72 °C	70 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	10 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pET28c(+)_DrBPhy_6x-C-His

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	DrBPhy 1 <i>BspHI</i> fw	CCACAATC <u>ATG</u> AGCCGGGACCCGTTGCC
Rückwärtsprimer	DrBPhy 755 <i>XhoI</i> rv	GCTTGCTCGAGGGCATCGGCGGCTCC
Template	Genomische DNA aus <i>Deinococcus radiodurans</i> (Typstamm DSM 20539)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	GC-Puffer
3. Annealing	66-72 °C	60 s	35	
4. Extension	72 °C	70 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	10 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pET28c(+)_DrBPhy-1-506 (PCD) für Fusion pET28c(+)_LAPD+2_6x-N-His (nicht *E.-coli*-adaptiert)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	DrBPhy 1 <i>NdeI</i> fw	CCACAACAT <u>ATG</u> AGCCGGGACCCGTTGCC
Rückwärtsprimer	DrBPhy 506 <i>BsrGI-Sall</i> rv	CTGTTGTCGACATGCTATGTACAGCAGGCGCTC GCCCAGCG
Template	Genomische DNA aus <i>Deinococcus radiodurans</i> (Typstamm DSM 20539)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	GC-Puffer
3. Annealing	72 °C	60 s	35	
4. Extension	72 °C	45 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

HsPDE2A-553-941 (CAT) für Fusion pET28c(+)_LAPD+2_6x-N-His (nicht *E.-coli*-adaptiert)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	PDE 553 <i>BsrGI</i> fw	GCTCCT <u>G</u> TACAAAAAGTGAATGAGGCTCAGTATCG
Rückwärtsprimer	PDE 941 <i>Sall</i> rv	GGTGTGTCGACT <u>TC</u> ACTCAGCATCAAGGCTGC
Template	cDNA HsPDE2A; imaGenes	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	HF-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	
3. Annealing	58 °C	60 s	35	
4. Extension	72 °C	45 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pET28c(+)_LAPD+2_6x-C-His (*E.-coli*-adaptiert)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	DrBPhy 1 <i>Bsp</i> HI fw	CCACAAT <u>TCATGA</u> GCCGGGACCCGTTGCC
Rückwärtsprimer	HsPDE2Aco 941 <i>Xho</i> I rv	GCTTGCTCGAGTTCGGCATCCAGGCTACAGC
Template	pET28c(+)_LAPD+2_6x-N-His (nicht <i>E.-coli</i> -adaptiert)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
7. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO GC-Puffer
8. Denaturierung	98 °C	30 s	35	
9. Annealing	60-69 °C	60 s	35	
10. Extension	72 °C	90 s	35	
11. Finale Extension	72 °C	10 min	1	
12. Stop	10 °C	∞	1	

pBADM-30(+)_LAPD+2_6x-N-His (*E.-coli*-adaptiert)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	DrBPhy 1 <i>Spe</i> I fw	GCAACA <u>ACTAGT</u> ATGAGCCGGGACCCGTTGC
Rückwärtsprimer	HsPDE2Aco 941 <i>Kpn</i> I rv	CGTTGGGT <u>ACCTCA</u> TTTCGGCATCCAGGCTACAGC
Template	pET28c(+)_LAPD+2_6x-N-His (<i>E.-coli</i> -adaptiert)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO GC-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	
3. Annealing	61-69 °C	60 s	35	
4. Extension	72 °C	90 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	10 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pASK43(+)_LAPD+2_C-Strep (*E.-coli*-adaptiert)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	<i>DrBPhy 1 NheI fw</i>	CGACAAGCTAGC ATG AGCCGGGACCCGTTGC
Rückwärtsprimer	<i>PDE2Aco 941 Eco47III rv</i>	CGTGGAGCGCTTTCGGCATCCAGGCTACAGC
Template	pET28c(+)_LAPD+2_6x-N-His (<i>E.-coli</i> -adaptiert)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	GC-Puffer
3. Annealing	61-67 °C	60 s	35	
4. Extension	72 °C	90 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	10 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pASK43(+)_LAPD+2_6x-C-His (*E.-coli*-adaptiert)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	<i>DrBPhy 1 XbaI fw</i>	CGAACCTCTAGA ATG AGCCGGGACCCGTTGC
Rückwärtsprimer	<i>HsPDE2Aco 941 Hind III rv</i>	CGTAAGCTT TCA GTGATGGTGATGGTGATGTTTCGGCATCCAGGCTACAGC
Template	pET28c(+)_LAPD+2_6x-N-His (<i>E.-coli</i> -adaptiert)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	GC-Puffer
3. Annealing	61-67 °C	60 s	35	
4. Extension	72 °C	90 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	10 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pASK43(+)_PaBPhy-1-497 (PCD) für Fusion pASK43(+)_PaBPD+2_6x-C-His (*E.-coli*-adaptiert)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	PaBPhy 1 <i>NheI</i> fw	CCACGCTAGCATGACGAGCATCACCCC GGTTACC
Rückwärtsprimer	PaBPhy 497 <i>KspAI-HindIII</i> rv	GGTGAAGCTTGCTCGTTACTTTTTTG TACAGCGCATGGTTGAGGCACAGTTC
Template	pET24a(+)_PaBPhy_1-497	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	GC-Puffer
3. Annealing	65-72 °C	30 s	35	
4. Extension	72 °C	30 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

HsPDE2A-553-941 (CAT) für Fusion pASK43(+)_PaBPD+2_6x-C-His (*E.-coli*-adaptiert)

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	HsPDE 553 <i>KspAI</i> fw	CCACGTTAACGAGGCCAGTATCGCTCTCATCTGG
Rückwärtsprimer	HsPDE 941 <i>HindIII</i> rv	GGTGAAGCTTTCAGTGATGGTGATGGTGATGTTCCG CATC
Template	pASK43(+)_LAPD+2_6x-His	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	HF-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	10 s	35	
3. Annealing	60-69 °C	30 s	35	
4. Extension	72 °C	30 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pQE81_DrBphO

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	BphO 1 <i>EcoRI</i> ext fw	CCACGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAGT ATG CTCCGAC TCATGATCATG
Rückwärtsprimer	BphO 202 <i>Sall</i> rv	GGTGTGGT TCGAC TCAT GCCTGGGCGACCTCAGGC
Template	Genomische DNA aus <i>Deinococcus radiodurans</i> (Typstamm DSM 20539)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	5% DMSO GC-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	30 s	35	
3. Annealing	64-72 °C	30 s	35	
4. Extension	72 °C	30 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pRARE-pKT270_SsHO1 (*NheI* und *SacI*)*NheI*

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	T5 term <i>NheI</i> fw	GCGGCTAGCGATAAGTTGTCACGCTAGGTA
Rückwärtsprimer	T5 prom <i>NheI</i> rv	CGTGGTGCTAGCAAATCATAAAAAATTTATTTGC
Template	pKT270_SsHO1	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	HF-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	10 s	35	
3. Annealing	54-58 °C	30 s	35	
4. Extension	72 °C	15 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

SacI

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	T5 term <i>SacI</i> fw	GCGGAGCTCGATAAGTTGTCACGCTAGGTA
Rückwärtsprimer	T5 prom <i>SacI</i> rv	CGTGGTGAGCTCAAATCATAAAAAATTTATTGTC
Template	pKT270_SsHO1	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	HF-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	10 s	35	
3. Annealing	54-58 °C	30 s	35	
4. Extension	72 °C	15 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

DrBPhy-1-506 (PCD) humanisiert für Fusion pASK43(+)_LAPD_EGFP

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	DrBPhy hum <i>NheI</i> fw	CAACAAGCTAGCATGAGCAGGGACC
Rückwärtsprimer	DrBPhy hum <i>Hind III</i> rv	GTTGTTAAGCTTGGTGCAAGCGCTC
Template	DrBPhy-PCD-HUM (Geneart)	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	GC-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	10 s	35	
3. Annealing	60-70 °C	30 s	35	
4. Extension	72 °C	30 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

HsPDE2A-555-941 (CAT) für Fusion pASK43(+)_LAPD_EGFP

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	PDE <i>AfeI</i> + TG fw	CACAACAGCGCTTGAAAAAAGTGAATGAGGCTCAG TATCG
Rückwärtsprimer	PDE STOP <i>HindIII</i>	GTTTGTAAGCTTCTCAGCATCAAGGCTGCAG
Template	pASK43(+)_LAPD_6x-His	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
7. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	HF-Puffer
8. Denaturierung	98 °C	30 s	35	
9. Annealing	58 °C	60 s	35	
10. Extension	72 °C	45 s	35	
11. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
12. Stop	10 °C	∞	1	

pGEM-HE_LAPD

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	BP-1 hum 1 <i>AgeI</i> fw	CCACC <u>ACCGGT</u> ATGAGCAGGGACCCCCTGCCCTTC TTC
Rückwärtsprimer	BP-1 hum 893 <i>BsiWI</i> rv	GTGGT <u>CGTACGCT</u> CAGCATCAAGGCTGCAGCAGCC ATTG
Template	pEGFP-N1_LAPD_EGFP	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	GC-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	10 s	35	
3. Annealing	58-70 °C	30 s	35	
4. Extension	72 °C	40 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

pEGFP-N1_LAPD minus EGFP

	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Vorwärtsprimer	<i>DrBPhy</i> hum <i>NheI</i> fw	CAACAAGCTAGCATGAGCAGGGACC
Rückwärtsprimer	BP-1 hum minus EGFP +STOP <i>NotI</i>	GGTTGT <u>GCGGCCGC</u> TTA CTCAGCATCAAGGCTGCA G
Template	pEGFP-N1_LAPD_EGFP	

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl	Abweichungen
1. Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1	GC-Puffer
2. Denaturierung	98 °C	10 s	35	
3. Annealing	68-72 °C	30 s	35	
4. Extension	72 °C	40 s	35	
5. Finale Extension	72 °C	5 min	1	
6. Stop	10 °C	∞	1	

5.4.3 Mutagenese

LAPD-4 ← LAPD+2 → LAPD+7

Ziel (pASK43(+))	Template (pASK43(+))	Oligonukleotide	Sequenz
LAPD-4	LAPD-3	ΔN558 fw ΔN558 rv	CTGGGCGAGCGCCTGGAGGCCAGTATC GATACTGGGCCTCCAGGCGCTCGCCCAG
LAPD-3	LAPD-2	ΔV557 fw ΔV557 rv	CTGGGCGAGCGCCTGAACGAGGCC GGGCCTCGTTCAGGCGCTCGCCCAG
LAPD-2	LAPD-1	ΔK556 fw ΔK556 rv	CTGGGCGAGCGCCTGGTGAACGAGG CCTCGTTCACCGAGGCGCTCGCCCAG
LAPD-1	LAPD	ΔK555 fw ΔK555 rv	CTGGGCGAGCGCCTGAAAGTGAACGAG CTCGTTCACTTTCAGGCGCTCGCCCAG
LAPD	LAPD+1	ΔY554 fw ΔY554 rv	GCTGGGCGAGCGCCTGAAAAAGTGAACGAGG CCTCGTTCACTTTTTTCAGGCGCTCGCCCAGC
LAPD+1	LAPD+2	ΔL553 fw ΔL553 rv	GGGCGAGCGCCTGTACAAAAAGTG CACTTTTTTGTACAGGCGCTCGCCC
LAPD+2	Durch Restriktion und Ligation zusammengesetzt (s. Abschnitt 3.1.1.)		
LAPD+3	LAPD+2	IS507 fw IS507 rv	GCGAGCGCCTGAGCCTGTACAAAAAGTG CACTTTTTTGTACAGGCTCAGGCGCTCGC
LAPD+4	LAPD+3	IV508 fw IV508 rv	GAGCGCCTGAGCGTGCTGTACAAAAAGTG CACTTTTTTGTACAGCAGCTCAGGCGCTC
LAPD+5	LAPD+4	II509 fw II509 rv	CGCCTGAGCGTGATTCTGTACAAAAAGTG CACTTTTTTGTACAGAATCACGCTCAGGCG
LAPD+6	LAPD+5	IR510 fw IR510 rv	CTGAGCGTGATTCGTCTGTACAAAAAGTG CACTTTTTTGTACAGACGAATCACGCTCAG
LAPD+7	LAPD+6	ID511 fw ID511 rv	GAGCGTGATTCGTGACCTGTACAAAAAGTG CACTTTTTTGTACAGGTCACGAATCACGCTC

LAPD-C24A

Ziel	Template	Oligonukleotide	Sequenz
pASK43(+)_	pASK43(+)_	LAPD C24A fw	CCACCGAGAACGCCGAGCGCGAGCC
LAPD-C24A-6xHis	LAPD-6xHis		
		LAPD C24A rv	GGCTCGCGCTCGGCGTTCTCGGTGG

5.5 Abkürzungen

A	Absorption
AA	<i>amino acid residue</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetracyclin
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ARA	Arabinose
AS	Aminosäurerest
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
AZ	Adenylylzyklase
B	blau
BCECF	Bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluoreszein
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLUF	<i>blue-light sensors using flavin adenine dinucleotide</i>
bp	Basenpaar
BPhy	Bakteriophytochrom
BV	Biliverdin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
ChR	Kanalrhodopsin
cNMP	zyklisches Nukleosid-3',5'-monophosphat
Cph	cyanobakterielles Phytochrom
D	Dunkel
DHp	Phosphoakzeptor-Domäne (<i>dimerization histidine phosphotransfer</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dph	Diatomeen-Phytochrom
ΔG°	freie Standardenthalpie
CBB	Coomassie Brilliant Blue

CBCR	Cyanobakteriochrom
CBD	chromophorbindende Domäne
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CIB	<i>cryptochrome-interacting basic helix-loop-helix</i>
CMV	Cytomegalovirus
CNG	zyklisches-Nukleotid-gesteuerter Kanal (<i>cyclic nucleotide gated channel</i>)
Co-NTA	Kobalt-Nitrilotriacetat
Cry	Cryptochrom
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
FKS	fötales Kälberserum
Fph	Pilz-Phytochrom (<i>funga</i>)
FR	Fernrot(licht)
G	grün
g	Erdbeschleunigung
GAF	<i>cGMP phosphodiesterase/ adenylyl cyclase/ FhlA</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GZ	Guanylylzyklase
h	Plancksches Wirkungsquantum
His	6-facher Histidin-Tag
HK	Histidinkinase
HO	Hämoxygenase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HWB	Halbwertsbreite
I	Intensität
IB	Isosbestischer Punkt
IF	Interferenzfilter
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IR	Infrarot

K	Kontrolle
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Licht
Lac	Laktose
LAPD	Lichtaktivierte Phosphodiesterase
LB	<i>lysogeny broth</i>
LOV	<i>light-oxygen-voltage</i>
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
λ_{Ex}	Exzitationswellenlänge
λ_{max}	Wellenlänge des Absorptionsmaximums
M	Molar [mol l^{-1}]
MW	Molekulargewicht [kDa]
NHR	<i>N-terminal hydrophobic region</i>
NMP	Nukleosidmonophosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ν	Frequenz
OD	Optische Dichte
PAC	Photoaktivierte Adenylylzyklase (<i>photoactivated adenylate cyclase</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	<i>Per-ARNT-Sim</i>
PCB	Phycocyanobilin
PCD	photosensorisches Modul (<i>photosensory core domain</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
Pfam	Proteinfamilien
P_{fr}	Fernrotlicht-absorbierende Form (Phytochrom)
PHY	<i>phytochrome</i> (Domäne)
Phy	Phytochrom
$P\Phi B$	Phytochromobilin
PIF	<i>phytochrome interacting factor</i>
P_r	Rotlicht-absorbierende Form (Phytochrom)
R	Rot(licht)
RLU	<i>relative light units</i>
RMSD	Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung (<i>root mean square deviation</i>)

Anhang

RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
<i>sp.</i>	Spezies
Strep	Streptavidin-Tag
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
UCR	<i>upstream conserved regulatory</i>
UV	ultraviolett
vis	sichtbar (<i>visible</i>)
v_{\max}	Maximalgeschwindigkeit [$\mu\text{M (nM Enzym)}^{-1} \text{ min}^{-1}$]
WT	Wildtyp

5.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Schattenvermeidung bei Landpflanzen.	2
Abbildung 2.	Schematischer modularer Aufbau von biologischen Photorezeptoren	3
Abbildung 3.	Spektrale Absorptions-Bandbreite von biologischen Photorezeptoren	4
Abbildung 4.	Phylogenetische Analyse der Phytochrom-Superfamilie	5
Abbildung 5.	Domänenarchitektur und Chromophorkonfiguration innerhalb der Phytochrom-Superfamilie	7
Abbildung 6.	Lineare Tetrapyrrol-Chromophore von Phytochromen und Tetrapyrrol-Einbau durch das PCD-Modul.....	9
Abbildung 7.	Photozyklus von kanonischem R/FR-Bakteriophytochrom und Photoisomerisierung des Biliverdin-Addukts (<i>DrBPhy</i>).....	11
Abbildung 8.	Struktur der Chromophorbindungsdomäne (CBD) von <i>DrBPhy</i> in der <i>P_r</i> -Form.....	16
Abbildung 9.	Struktur des photosensorischen Moduls (PCD) von <i>PaBPhy</i> in der <i>P_{fr}</i> -Form.....	18
Abbildung 10.	Optogenetik.....	21
Abbildung 11.	Schematische Gliederung synthetischer Photorezeptoren	25
Abbildung 12.	Zyklische Nukleotide (cNMPs), PDE2-Inhibitor, Hydrolyse von cGMP	30
Abbildung 13.	Domänenarchitektur und cNMP-Selektivität der Säuger-PDE- Superfamilie	32
Abbildung 14.	Struktur der katalytischen Domäne, des aktiven Zentrums und der Substratbindungstasche von katalytisch inaktiver <i>HsPDE10A2</i> - <i>D564A</i>	34
Abbildung 15.	Struktur des GAF-A—GAF-B—PDE-Tandems, der GAF-Domäne und PDE-Domäne von <i>HsPDE2A</i>	38
Abbildung 16.	Aktivierungs-Modell von <i>HsPDE2A</i> -WT ((GAF) ₂ -PDE-Tandem)	40
Abbildung 17.	Ziel der Arbeit.....	42
Abbildung 18.	BCECF-basierter fluorimetrischer Nachweis der cNMP-Hydrolyse- Aktivität von LAPD.....	61
Abbildung 19.	Konstruktion der rotlichtaktivierten Phosphodiesterase.....	64

Abbildung 20.	Detailaufnahme der strukturellen Überlagerung von <i>HsPDE2A</i> und <i>PaBPhy</i> und strukturbasiertes Linkeralignment von <i>PaBPhy</i> , <i>HsPDE2A</i> und <i>DrBPhy</i>	65
Abbildung 21.	<i>In-vivo</i> -Rekonstitution von Holo- <i>DrBPhy</i> -PCD-Konstrukten mit Chromophor während Expression im 5-ml-Maßstab	70
Abbildung 22.	Expression im 500-ml-Maßstab von LAPD+2 im pET28c(+)-Vektor in CmpX13-Zellen	72
Abbildung 23.	Expression von pET28c(+)_LAPD+2_N-His nach <i>E.-coli</i> -Kodonoptimierung (<i>HsPDE2A</i> 553-941) in CmpX13-Zellen	74
Abbildung 24.	Expression von LAPD+2_N-His in pBADM-30(+) in CmpX13-Zellen	75
Abbildung 25.	Expression von pASK43(+)_LAPD+2_C-Strep in CmpX13-Zellen	77
Abbildung 26.	Reinigung von LAPD+2_C-His nach Expression im pASK43(+)-Kontext in CmpX13	78
Abbildung 27.	Reinigung von LAPD+2_C-His nach Expression im pASK43(+)-Kontext in BL21(DE3)-Zellen	81
Abbildung 28.	Stationäre UV/vis-Spektren und Photochemie von gereinigter LAPD_C-His	84
Abbildung 29.	Rotlichtaktivierte cGMP-Hydrolyse durch LAPD	88
Abbildung 30.	Rotlichtaktivierte cAMP-Hydrolyse durch LAPD	90
Abbildung 31.	cGMP-Umsatz von LAPD bei verschiedenen Lichtqualitäten	92
Abbildung 32.	PDE-Aktivität von LAPD-Linkervarianten unter rotlicht- und dunkeladaptierten Bedingungen	94
Abbildung 33.	UV/vis-Spektrum von LAPD-C24A, Bestimmung des Apoprotein-Anteils in gereinigter LAPD-Probe und PDE-Aktivität von LAPD-C24A	96
Abbildung 34.	Aufbau des elektrophysiologischen LAPD-Funktionstests in <i>Xenopus laevis</i> Oozyten	97
Abbildung 35.	Lichtaktivierte CNG2A-Ströme im Oozytenfunktionstest bei Koexpression von LAPD und bPAC	101
Abbildung 36.	PDE-Reporterzelllinie (CHO-Schema)	104

Abbildung 37.	Expression von LAPD_EGFP in CHO-Zellkultur (PDE-Reporterzelllinie)	106
Abbildung 38.	Expression von LAPD_EGFP und freiem EGFP in CHO-Zellkultur.....	107
Abbildung 39.	LAPD vermittelt lichtaktivierte cGMP-Hydrolyse in CHO-Zellen	109
Abbildung 40.	GAF-Effektor-Architekturen	118
Abbildung 41.	Modell der LAPD-Aktivierung	120
Abbildung 42.	Strukturen der regulatorischen Tandems von <i>DrBPhy</i> und <i>HsPDE2A</i>	122
Abbildung 43.	Multiple Sequenzalignments der Linkerregionen innerhalb von PHY—Histidinkinase (HK)- und GAF—PDE-Domänenarchitektur	128
Abbildung 44.	Helikale dimere Grenzflächen in <i>HsPDE2A</i> und <i>PaBPhy</i>	129
Abbildung 45.	Strukturbasierte Linkeralignments zur Konstruktion von YF1 und LAPD	130
Abbildung 46.	Homologiemodelle von <i>Nostoc punctiforme</i> (\triangleq <i>Anabaena sp.</i>) CyaB1 und <i>Rhodobacter sphaeroides</i> BphG1 für die Konstruktion von IlaCs.	133
Abbildung 47.	Modell zur LAPD-Aktivierung nach Monod, Wyman & Changeux (MWC-Modell) und Möglich & Moffat.....	136
Abbildung 48.	Schematische Darstellung eines Coiled-Coils	138
Abbildung 49.	Negative-Stain-EM-Aufnahme von LAPD.....	141
Abbildung 50.	LAPD-Expression in Zebrafischlarven.....	148
Abbildung 51.	Initiale Fusionsstelle der Konstruktion von LAPD+2.....	157
Abbildung 52.	Modell von LAPD.....	158
Abbildung 53.	Expression von <i>PaBPD+2</i>	159
Abbildung 54.	Charakterisierung von <i>PaBPD+2</i>	162

6 Literaturverzeichnis

- [1] D. Presti, M. Delbrück, Photoreceptors for biosynthesis, energy storage and vision, *Plant Cell Environ.*, 1 (1978) 81–100.
- [2] D.I. Arnon, Conversion of Light into Chemical Energy in Photosynthesis, *Nature*, 184 (1959) 10–21.
- [3] L.L. Shipman, T.M. Cotton, J.R. Norris, J.J. Katz, New proposal for structure of special-pair chlorophyll, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73 (1976) 1791–1794.
- [4] D.I. Arnon, The light reactions of photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 68 (1971) 2883–2892.
- [5] A.T. Wilson, M. Calvin, The Photosynthetic Cycle CO₂ Dependent Transients, *J. Am. Chem. Soc.*, 77 (1955) 5948–5957.
- [6] W.R. Briggs, J.L. Spudich, *Handbook of Photosensory Receptors*, John Wiley & Sons, 2006.
- [7] N.C. Rockwell, J.C. Lagarias, A brief history of phytochromes, *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.*, 11 (2010) 1172–1180.
- [8] J.J. Casal, Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64 (2013) 403–427.
- [9] K.A. Franklin, Shade avoidance, *New Phytol.*, 179 (2008) 930–944.
- [10] W.J. Gehring, New Perspectives on Eye Development and the Evolution of Eyes and Photoreceptors, *J. Hered.*, 96 (2005) 171–184.
- [11] P. Hegemann, Algal sensory photoreceptors, *Annu Rev Plant Biol.*, 59 (2008) 167–189.
- [12] M. Iseki, S. Matsunaga, A. Murakami, K. Ohno, K. Shiga, K. Yoshida, M. Sugai, T. Takahashi, T. Hori, M. Watanabe, A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*, *Nature*, 415 (2002) 1047–51.
- [13] E. Piccinni, M. Mammi, Motor Apparatus of *Euglena Gracilis*: Ultrastructure of the Basal Portion of the Flagellum and the Paraflagellar Body, *Bolletino Zool.*, 45 (1978) 405–414.
- [14] K.A. Franklin, G.C. Whitelam, Phytochromes and Shade-avoidance Responses in Plants, *Ann. Bot.*, 96 (2005) 169–175.
- [15] A. Möglich, K. Moffat, Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 9 (2010) 1286–1300.
- [16] O.P. Ernst, D.T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L.S. Brown, H. Kandori, Microbial and Animal Rhodopsins: Structures, Functions, and Molecular Mechanisms, *Chem. Rev.*, 114 (2013) 126–163.
- [17] J.E. Schultz, J. Natarajan, Regulated unfolding: a basic principle of intraprotein signaling in modular proteins, *Trends Biochem. Sci.*, 38 (2013) 538–545.
- [18] A. Losi, W. Gärtner, Shedding (blue) light on algal gene expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (2008) 7–8.
- [19] A. Möglich, X. Yang, R.A. Ayers, K. Moffat, Structure and Function of Plant Photoreceptors, *Annu Rev Plant Biol.*, 61 (2010) 21–47.
- [20] L. Rizzini, J.-J. Favory, C. Cloix, D. Faggionato, A. O'Hara, E. Kaiserli, R. Baumeister, E. Schäfer, F. Nagy, G.I. Jenkins, R. Ulm, Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 Protein, *Science*, 332 (2011) 103–106.
- [21] K.D. Piatkevich, F.V. Subach, V.V. Verkhusha, Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals, *Chem. Soc. Rev.*, 42 (2013) 3441–3452.

- [22] N.C. Rockwell, D. Duanmu, S.S. Martin, C. Bachy, D.C. Price, D. Bhattacharya, A.Z. Worden, J.C. Lagarias, Eukaryotic algal phytochromes span the visible spectrum, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111 (2014) 3871–3876.
- [23] A.J. Reid, J.A.G. Ranea, A.B. Clegg, C.A. Orengo, CODA: Accurate Detection of Functional Associations between Proteins in Eukaryotic Genomes Using Domain Fusion, *PLoS ONE*, 5 (2010) e10908.
- [24] N. Suetsugu, F. Mittmann, G. Wagner, J. Hughes, M. Wada, A chimeric photoreceptor gene, NEOCHROME, has arisen twice during plant evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102 (2005) 13705–13709.
- [25] W.E. Balch, L.J. Magrum, G.E. Fox, R.S. Wolfe, C.R. Woese, An ancient divergence among the bacteria, *J. Mol. Evol.*, 9 (1977) 305–311.
- [26] C.R. Woese, G.E. Fox, Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 (1977) 5088–5090.
- [27] U. Krauss, B.Q. Minh, A. Losi, W. Gärtner, T. Eggert, A. von Haeseler, K.-E. Jaeger, Distribution and Phylogeny of Light-Oxygen-Voltage-Blue-Light-Signaling Proteins in the Three Kingdoms of Life, *J. Bacteriol.*, 191 (2009) 7234–7242.
- [28] B. Karniol, J.R. Wagner, J.M. Walker, R.D. Vierstra, Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors, *Biochem. J.*, 392 (2005) 103.
- [29] J.M. Christie, A.S. Arvai, K.J. Baxter, M. Heilmann, A.J. Pratt, A. O'Hara, S.M. Kelly, M. Hothorn, B.O. Smith, K. Hitomi, G.I. Jenkins, E.D. Getzoff, Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges, *Science*, 335 (2012) 1492–1496.
- [30] M. Heijde, R. Ulm, UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants, *Trends Plant Sci.*, 17 (2012) 230–237.
- [31] M. Luck, T. Mathes, S. Bruun, R. Fudim, R. Hagedorn, T.M.T. Nguyen, S. Kateriya, J.T.M. Kennis, P. Hildebrandt, P. Hegemann, A Photochromic Histidine Kinase Rhodopsin (HKR1) That Is Bimodally Switched by Ultraviolet and Blue Light, *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 40083–40090.
- [32] A.S. Chuong, M.L. Miri, V. Busskamp, G.A.C. Matthews, L.C. Acker, A.T. Sørensen, A. Young, N.C. Klapoetke, M.A. Henninger, S.B. Kodandaramaiah, M. Ogawa, S.B. Ramanlal, R.C. Bandler, B.D. Allen, C.R. Forest, B.Y. Chow, X. Han, Y. Lin, K.M. Tye, B. Roska, et al., Noninvasive optical inhibition with a red-shifted microbial rhodopsin, *Nat. Neurosci.*, 17 (2014) 1123–1129.
- [33] N.C. Rockwell, S.S. Martin, K. Feoktistova, J.C. Lagarias, Diverse two-cysteine photocycles in phytochromes and cyanobacteriochromes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108 (2011) 11854–11859.
- [34] X. Yang, E.A. Stojkovic, J. Kuk, K. Moffat, Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion, *Proc Natl Acad Sci U A*, 104 (2007) 12571–6.
- [35] X. Yang, J. Kuk, K. Moffat, Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: photoconversion and signal transduction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (2008) 14715–14720.
- [36] A.T. Ulijasz, R.D. Vierstra, Phytochrome structure and photochemistry: recent advances toward a complete molecular picture, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14 (2011) 498–506.
- [37] Y. Hirose, T. Shimada, R. Narikawa, M. Katayama, M. Ikeuchi, Cyanobacteriochrome CcaS is the green light receptor that induces the

- expression of phycobilisome linker protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (2008) 9528–9533.
- [38] Y. Hirose, N.C. Rockwell, K. Nishiyama, R. Narikawa, Y. Ukaji, K. Inomata, J.C. Lagarias, M. Ikeuchi, Green/red cyanobacteriochromes regulate complementary chromatic acclimation via a protochromic photocycle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110 (2013) 4974–4979.
- [39] M. Ikeuchi, T. Ishizuka, Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria, *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.*, 7 (2008) 1159–1167.
- [40] N.C. Rockwell, S.S. Martin, A.G. Gulevich, J.C. Lagarias, Phycoviolobilin Formation and Spectral Tuning in the DXCF Cyanobacteriochrome Subfamily, *Biochemistry (Mosc.)*, 51 (2012) 1449–1463.
- [41] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 20, *Bioinformatics*, 23 (2007) 2947–2948.
- [42] R.D. Vierstra, P.H. Quail, Photochemistry of 124 Kilodalton Avena Phytochrome In Vitro, *Plant Physiol.*, 72 (1983) 264–267.
- [43] J.C. Litts, J.M. Kelly, J.C. Lagarias, Structure-function studies on phytochrome Preliminary characterization of highly purified phytochrome from *Avena sativa* enriched in the 124-kilodalton species, *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 11025–11031.
- [44] S. Mathews, Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments, *Mol. Ecol.*, 15 (2006) 3483–3503.
- [45] P. Leivar, P.H. Quail, PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub, *Trends Plant Sci.*, 16 (2011) 19–28.
- [46] D. Wagner, J.M. Tepperman, P.H. Quail, Overexpression of Phytochrome B Induces a Short Hypocotyl Phenotype in Transgenic *Arabidopsis*, *Plant Cell Online*, 3 (1991) 1275–1288.
- [47] U. Sweere, K. Eichenberg, J. Lohrmann, V. Mira-Rodado, I. Bäurle, J. Kudla, F. Nagy, E. Schäfer, K. Harter, Interaction of the Response Regulator ARR4 with Phytochrome B in Modulating Red Light Signaling, *Science*, 294 (2001) 1108–1111.
- [48] A. Castillon, H. Shen, E. Huq, Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks, *Trends Plant Sci.*, 12 (2007) 514–521.
- [49] P. Más, P.F. Devlin, S. Panda, S.A. Kay, Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2, *Nature*, 408 (2000) 207–211.
- [50] J.J. Casal, Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interactions in plants, *Photochem. Photobiol.*, 71 (2000) 1–11.
- [51] J. Hughes, T. Lamparter, F. Mittmann, E. Hartmann, W. Gärtner, A. Wilde, T. Börner, A prokaryotic phytochrome, *Nature*, 386 (1997) 663.
- [52] E. Giraud, A. Verméglio, Bacteriophytochromes in anoxygenic photosynthetic bacteria, *Photosynth. Res.*, 97 (2008) 141–153.
- [53] E. Giraud, J. Fardoux, N. Fourrier, L. Hannibal, B. Genty, P. Bouyer, B. Dreyfus, A. Verméglio, Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria, *Nature*, 417 (2002) 202–205.
- [54] K. Barkovits, B. Schubert, S. Heine, M. Scheer, N. Frankenberg-Dinkel, Function of the bacteriophytochrome BphP in the RpoS/Las quorum-sensing

- network of *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiol. Read. Engl.*, 157 (2011) 1651–1664.
- [55] S.J. Davis, A.V. Vener, R.D. Vierstra, Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria, *Science*, 286 (1999) 2517–2520.
 - [56] N.C. Rockwell, Y.S. Su, J.C. Lagarias, Phytochrome structure and signaling mechanisms, *Annu Rev Plant Biol*, 57 (2006) 837–858.
 - [57] R.A. Sharrock, The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily, *Genome Biol*, 9 (2008) 230.
 - [58] M.E. Auldrige, K.T. Forest, Bacterial phytochromes: More than meets the light, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 46 (2011) 67–88.
 - [59] M. Tarutina, D.A. Ryjenkov, M. Gomelsky, An Unorthodox Bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* Involved in Turnover of the Second Messenger c-di-GMP, *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 34751–34758.
 - [60] D. Bellini, M.Z. Papiz, Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor, *Struct. Lond. Engl.* 1993, 20 (2012) 1436–1446.
 - [61] S.-H. Wu, J.C. Lagarias, Defining the Bilin Lyase Domain: Lessons from the Extended Phytochrome Superfamily†, *Biochemistry (Mosc.)*, 39 (2000) 13487–13495.
 - [62] K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guillard, *The Porphyrin Handbook: Chlorophylls and bilins : biosynthesis, synthesis, and degradation*, Elsevier, 2003.
 - [63] T. Lamparter, N. Michael, O. Caspani, T. Miyata, K. Shirai, K. Inomata, Biliverdin Binds Covalently to *Agrobacterium* Phytochrome Agp1 via Its Ring A Vinyl Side Chain, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 33786–33792.
 - [64] S.H. Bhoo, S.J. Davis, J. Walker, B. Karniol, R.D. Vierstra, Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore, *Nature*, 414 (2001) 776–779.
 - [65] S. Brandt, D. von Stetten, M. Günther, P. Hildebrandt, N. Frankenberg-Dinkel, The Fungal Phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 34605–34614.
 - [66] A.C. Froehlich, B. Noh, R.D. Vierstra, J. Loros, J.C. Dunlap, Genetic and Molecular Analysis of Phytochromes from the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*, *Eukaryot. Cell*, 4 (2005) 2140–2152.
 - [67] J.R. Wagner, J.S. Brunzelle, K.T. Forest, R.D. Vierstra, A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome, *Nature*, 438 (2005) 325–331.
 - [68] J.R. Wagner, J. Zhang, J.S. Brunzelle, R.D. Vierstra, K.T. Forest, High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 12298–12309.
 - [69] L. Li, J.T. Murphy, J.C. Lagarias, Continuous Fluorescence Assay of Phytochrome Assembly in Vitro, *Biochemistry (Mosc.)*, 34 (1995) 7923–7930.
 - [70] J.R. Wagner, J. Zhang, D. von Stetten, M. Günther, D.H. Murgida, M.A. Mroginski, J.M. Walker, K.T. Forest, P. Hildebrandt, R.D. Vierstra, Mutational analysis of *Deinococcus radiodurans* bacteriophytochrome reveals key amino acids necessary for the photochromicity and proton exchange cycle of phytochromes, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 12212–12226.
 - [71] B. Quest, W. Gärtner, Chromophore selectivity in bacterial phytochromes, *Eur. J. Biochem.*, 271 (2004) 1117–1126.

- [72] N. Frankenberg-Dinkel, Bacterial heme oxygenases, *Antioxid. Redox Signal.*, 6 (2004) 825–834.
- [73] M. Medzihradszky, J. Bindics, É. Ádám, A. Viczián, É. Klement, S. Lorrain, P. Gyula, Z. Mérai, C. Fankhauser, K.F. Medzihradszky, T. Kunkel, E. Schäfer, F. Nagy, Phosphorylation of Phytochrome B Inhibits Light-Induced Signaling via Accelerated Dark Reversion in Arabidopsis, *Plant Cell Online*, 25 (2013) 535–544.
- [74] T. Rohmer, C. Lang, J. Hughes, L.O. Essen, W. Gärtner, J. Matysik, Light-induced chromophore activity and signal transduction in phytochromes observed by ¹³C and ¹⁵N magic-angle spinning NMR, *Proc Natl Acad Sci U A*, 105 (2008) 15229–34.
- [75] M.A. Mroginiski, D.H. Murgida, P. Hildebrandt, The Chromophore Structural Changes during the Photocycle of Phytochrome: A Combined Resonance Raman and Quantum Chemical Approach, *Acc. Chem. Res.*, 40 (2007) 258–266.
- [76] X. Yang, J. Kuk, K. Moffat, Conformational differences between the Pfr and Pr states in *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106 (2009) 15639–15644.
- [77] M.A. Mroginiski, D. von Stetten, F.V. Escobar, H.M. Strauss, S. Kaminski, P. Scheerer, M. Günther, D.H. Murgida, P. Schmieder, C. Bongards, W. Gärtner, J. Mailliet, J. Hughes, L.-O. Essen, P. Hildebrandt, Chromophore Structure of Cyanobacterial Phytochrome Cph1 in the Pr State: Reconciling Structural and Spectroscopic Data by QM/MM Calculations, *Biophys. J.*, 96 (2009) 4153–4163.
- [78] P. Schwinté, H. Foerstendorf, Z. Hussain, W. Gärtner, M.-A. Mroginiski, P. Hildebrandt, F. Siebert, FTIR Study of the Photoinduced Processes of Plant Phytochrome PhyA using Isotope-Labeled Bilins and Density Functional Theory Calculations, *Biophys. J.*, 95 (2008) 1256–1267.
- [79] N.C. Rockwell, L. Shang, S.S. Martin, J.C. Lagarias, Distinct classes of red/far-red photochemistry within the phytochrome superfamily, *Proc Natl Acad Sci U A*, 106 (2009) 6123–6127.
- [80] G. Rottwinkel, I. Oberpichler, T. Lamparter, Bathy Phytochromes in Rhizobial Soil Bacteria, *J. Bacteriol.*, 192 (2010) 5124–5133.
- [81] B. Karniol, R.D. Vierstra, The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100 (2003) 2807–2812.
- [82] K.C. Toh, E.A. Stojković, I.H.M. van Stokkum, K. Moffat, J.T.M. Kennis, Proton-transfer and hydrogen-bond interactions determine fluorescence quantum yield and photochemical efficiency of bacteriophytochrome, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107 (2010) 9170–9175.
- [83] M. Jaubert, J. Lavergne, J. Fardoux, L. Hannibal, L. Vuillet, J.-M. Adriano, P. Bouyer, D. Pignol, E. Giraud, A. Verméglio, A Singular Bacteriophytochrome Acquired by Lateral Gene Transfer, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 7320–7328.
- [84] F. Andel, K.C. Hasson, F. Gai, P.A. Anfinrud, R.A. Mathies, Femtosecond time-resolved spectroscopy of the primary photochemistry of phytochrome, *Biospectroscopy*, 3 (1997) 421–433.
- [85] M.G. Müller, I. Lindner, I. Martin, W. Gärtner, A.R. Holzwarth, Femtosecond Kinetics of Photoconversion of the Higher Plant Photoreceptor Phytochrome Carrying Native and Modified Chromophores, *Biophys. J.*, 94 (2008) 4370–4382.

- [86] K. Heyne, J. Herbst, D. Stehlik, B. Esteban, T. Lamparter, J. Hughes, R. Diller, Ultrafast dynamics of phytochrome from the cyanobacterium *synechocystis*, reconstituted with phycocyanobilin and phycoerythrobilin, *Biophys. J.*, 82 (2002) 1004–1016.
- [87] J.J. van Thor, K.L. Ronayne, M. Towrie, Formation of the Early Photoproduct Lumi-R of Cyanobacterial Phytochrome Cph1 Observed by Ultrafast Mid-Infrared Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2006) 126–132.
- [88] B. Borucki, D. von Stetten, S. Seibeck, T. Lamparter, N. Michael, M.A. Mroginski, H. Otto, D.H. Murgida, M.P. Heyn, P. Hildebrandt, Light-induced proton release of phytochrome is coupled to the transient deprotonation of the tetrapyrrole chromophore, *J Biol Chem*, 280 (2005) 34358–64.
- [89] É. Ádám, A. Hussong, J. Bindics, F. Wüst, A. Viczián, M. Essing, M. Medzihradszky, S. Kircher, E. Schäfer, F. Nagy, Altered Dark- and Photoconversion of Phytochrome B Mediate Extreme Light Sensitivity and Loss of Photoreversibility of the phyB-401 Mutant, *PLoS ONE*, 6 (2011) e27250.
- [90] J. Zhang, R.J. Stankey, R.D. Vierstra, Structure-Guided Engineering of Plant Phytochrome B with Altered Photochemistry and Light Signaling, *PLANT Physiol.*, 161 (2013) 1445–1457.
- [91] T.D. Elich, J. Chory, Biochemical characterization of *Arabidopsis* wild-type and mutant phytochrome B holoproteins, *Plant Cell*, 9 (1997) 2271–2280.
- [92] A. Nagatani, Phytochrome: structural basis for its functions, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 13 (2010) 565–570.
- [93] R. Dutta, L. Qin, M. Inouye, Histidine kinases: diversity of domain organization, *Mol. Microbiol.*, 34 (1999) 633–640.
- [94] M.P. Bhate, K.S. Molnar, M. Goulian, W.F. DeGrado, Signal Transduction in Histidine Kinases: Insights from New Structures, *Structure*, (n.d.).
- [95] H. Li, J. Zhang, R.D. Vierstra, H. Li, Quaternary organization of a phytochrome dimer as revealed by cryoelectron microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107 (2010) 10872–10877.
- [96] T. Lamparter, B. Esteban, J. Hughes, Phytochrome Cph1 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803, *Eur. J. Biochem.*, 268 (2001) 4720–4730.
- [97] K.-C. Yeh, S.-H. Wu, J.T. Murphy, J.C. Lagarias, A Cyanobacterial Phytochrome Two-Component Light Sensory System, *Science*, 277 (1997) 1505–1508.
- [98] T. Hübschmann, H.J.M.M. Jorissen, T. Börner, W. Gärtner, N.T. de Marsac, Phosphorylation of proteins in the light-dependent signalling pathway of a filamentous cyanobacterium, *Eur. J. Biochem.*, 268 (2001) 3383–3389.
- [99] X. Yang, Z. Ren, J. Kuk, K. Moffat, Temperature-scan cryocrystallography reveals reaction intermediates in bacteriophytochrome, *Nature*, 479 (2011) 428–432.
- [100] T. Lamparter, N. Michael, F. Mittmann, B. Esteban, Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99 (2002) 11628–11633.
- [101] E. Giraud, S. Zappa, L. Vuillet, J.-M. Adriano, L. Hannibal, J. Fardoux, C. Berthomieu, P. Bouyer, D. Pignol, A. Vermeglio, A New Type of Bacteriophytochrome Acts in Tandem with a Classical Bacteriophytochrome to Control the Antennae Synthesis in *Rhodospseudomonas palustris*, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 32389–32397.

- [102] K.R. Fixen, A.W. Baker, E.A. Stojković, J.T. Beatty, C.S. Harwood, Apobacteriophytochromes modulate bacterial photosynthesis in response to low light, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111 (2014) E237–E244.
- [103] S.E. Martinez, J.A. Beavo, W.G.J. Hol, GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides, *Mol. Interv.*, 2 (2002) 317–323.
- [104] L. Aravind, C.P. Ponting, The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins, *Trends Biochem Sci*, 22 (1997) 458–9.
- [105] Y.S. Ho, L.M. Burden, J.H. Hurley, Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor, *Embo J*, 19 (2000) 5288–5299.
- [106] D. von Stetten, S. Seibeck, N. Michael, P. Scheerer, M.A. Mroginiski, D.H. Murgida, N. Krauss, M.P. Heyn, P. Hildebrandt, B. Borucki, T. Lamparter, Highly Conserved Residues Asp-197 and His-250 in Agp1 Phytochrome Control the Proton Affinity of the Chromophore and Pfr Formation, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 2116–2123.
- [107] J. Salewski, F.V. Escobar, S. Kaminski, D. von Stetten, A. Keidel, Y. Rippers, N. Michael, P. Scheerer, P. Piwowarski, F. Bartl, N. Frankenberg-Dinkel, S. Ringsdorf, W. Gärtner, T. Lamparter, M.A. Mroginiski, P. Hildebrandt, Structure of the biliverdin cofactor in the pfr state of bathy and prototypical phytochromes, *J. Biol. Chem.*, 288 (2013) 16800–16814.
- [108] L.O. Essen, J. Mailliet, J. Hughes, The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state, *Proc Natl Acad Sci U A*, 105 (2008) 14709–14714.
- [109] T. Bornschlößl, D.M. Anstrom, E. Mey, J. Dzubiella, M. Rief, K.T. Forest, Tightening the Knot in Phytochrome by Single-Molecule Atomic Force Microscopy, *Biophys. J.*, 96 (2009) 1508–1514.
- [110] J.-M. Yoon, T.-R. Hahn, M.-H. Cho, J.-S. Jeon, S.H. Bhoo, Y.-K. Kwon, The PHY domain is required for conformational stability and spectral integrity of the bacteriophytochrome from *Deinococcus radiodurans*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369 (2008) 1120–1124.
- [111] B.L. Montgomery, J.C. Lagarias, Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light, *Trends Plant Sci.*, 7 (2002) 357–366.
- [112] K. Anders, G. Daminelli-Widany, M.A. Mroginiski, D. von Stetten, L.-O. Essen, Structure of the cyanobacterial phytochrome 2 photosensor implies a tryptophan switch for phytochrome signaling, *J. Biol. Chem.*, 288 (2013) 35714–35725.
- [113] A. Marina, C.D. Waldburger, W.A. Hendrickson, Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein, *Embo J*, 24 (2005) 4247–4259.
- [114] V. Anantharaman, S. Balaji, L. Aravind, The signaling helix: a common functional theme in diverse signaling proteins, *Biol Direct*, 1 (2006) 25.
- [115] D. Strickland, K. Moffat, T.R. Sosnick, Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein, *Proc Natl Acad Sci U A*, 105 (2008) 10709–10714.
- [116] R.D. Vierstra, J. Zhang, Phytochrome signaling: solving the Gordian knot with microbial relatives, *Trends Plant Sci.*, 16 (2011) 417–426.
- [117] K. Deisseroth, Optogenetics, *Nat Methods*, 8 (2011) 26–29.
- [118] P. Schoenenberger, Å. Grunditz, T. Rose, T.G. Oertner, Optimizing the spatial resolution of Channelrhodopsin-2 activation, *Brain Cell Biol.*, 36 (2008) 119–127.

- [119] A.M. Aravanis, L.-P. Wang, F. Zhang, L.A. Meltzer, M.Z. Mogri, M.B. Schneider, K. Deisseroth, An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology, *J. Neural Eng.*, 4 (2007) S143.
- [120] G. Nagel, T. Szellas, W. Huhn, S. Kateriya, N. Adeishvili, P. Berthold, D. Ollig, P. Hegemann, E. Bamberg, Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, *Proc Natl Acad Sci U A*, 100 (2003) 13940–13945.
- [121] F. Zhang, L.-P. Wang, M. Brauner, J.F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P.G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, K. Deisseroth, Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, *Nature*, 446 (2007) 633–639.
- [122] F. Zhang, J. Vierock, O. Yizhar, L.E. Fenno, S. Tsunoda, A. Kianianmomeni, M. Prigge, A. Berndt, J. Cushman, J. Polle, J. Magnuson, P. Hegemann, K. Deisseroth, The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools, *Cell*, 147 (2011) 1446–1457.
- [123] E.S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, *Nat. Neurosci.*, 8 (2005) 1263–1268.
- [124] P. van Bergeijk, M. Adrian, C.C. Hoogenraad, L.C. Kapitein, Optogenetic control of organelle transport and positioning, *Nature*, 518 (2015) 111–114.
- [125] D. Strickland, Y. Lin, E. Wagner, C.M. Hope, J. Zayner, C. Antoniou, T.R. Sosnick, E.L. Weiss, M. Glotzer, TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology, *Nat. Methods*, 9 (2012) 379–384.
- [126] S. Schröder-Lang, M. Schwärzel, R. Seifert, T. Strünker, S. Kateriya, J. Looser, M. Watanabe, U.B. Kaupp, P. Hegemann, G. Nagel, Fast manipulation of cellular cAMP level by light in vivo, *Nat Methods*, 4 (2007) 39–42.
- [127] M. Stierl, P. Stumpf, D. Udvari, R. Gueta, R. Hagedorn, A. Losi, W. Gärtner, L. Petereit, M. Efetova, M. Schwarzel, T.G. Oertner, G. Nagel, P. Hegemann, Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*, *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 1181–1188.
- [128] M.-H. Ryu, O.V. Moskvina, J. Siltberg-Liberles, M. Gomelsky, Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications, *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 41501–41508.
- [129] S. Raffelberg, L. Wang, S. Gao, A. Losi, W. Gärtner, G. Nagel, A LOV-domain-mediated blue-light-activated adenylyl cyclase from the cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* PCC 7420, *Biochem. J.*, 455 (2013) 359–365.
- [130] A. Hartmann, R.D. Arroyo-Olarte, K. Imkeller, P. Hegemann, R. Lucius, N. Gupta, Optogenetic modulation of an adenylyl cyclase in *Toxoplasma gondii* demonstrates a requirement of the parasite cAMP for host-cell invasion and stage differentiation, *J. Biol. Chem.*, 288 (2013) 13705–13717.
- [131] R.J. De Marco, A.H. Groneberg, C.-M. Yeh, L.A. Castillo Ramírez, S. Ryu, Optogenetic elevation of endogenous glucocorticoid level in larval zebrafish, *Front. Neural Circuits*, 7 (2013) 82.
- [132] J. Wietek, J.S. Wiegert, N. Adeishvili, F. Schneider, H. Watanabe, S.P. Tsunoda, A. Vogt, M. Elstner, T.G. Oertner, P. Hegemann, Conversion of Channelrhodopsin into a Light-Gated Chloride Channel, *Science*, (2014).
- [133] A. Berndt, S.Y. Lee, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth, Structure-Guided Transformation of Channelrhodopsin into a Light-Activated Chloride Channel, *Science*, 344 (2014) 420–424.

- [134] A. Berndt, P. Schoenenberger, J. Mattis, K.M. Tye, K. Deisseroth, P. Hegemann, T.G. Oertner, High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108 (2011) 7595–7600.
- [135] K. Erbguth, M. Prigge, F. Schneider, P. Hegemann, A. Gottschalk, Bimodal Activation of Different Neuron Classes with the Spectrally Red-Shifted Channelrhodopsin Chimera C1V1 in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS ONE*, 7 (2012) e46827.
- [136] P. Hegemann, A. Möglich, Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools, *Nat. Methods*, 8 (2011) 39–42.
- [137] A. Möglich, R.A. Ayers, K. Moffat, Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases, *J. Mol. Biol.*, 385 (2009) 1433–1444.
- [138] Y.I. Wu, D. Frey, O.I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, K.M. Hahn, A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells, *Nature*, 461 (2009) 104–108.
- [139] M. Weitzman, K.M. Hahn, Optogenetic approaches to cell migration and beyond, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 30 (2014) 112–120.
- [140] G.P. Pathak, J.D. Vrana, C.L. Tucker, Optogenetic control of cell function using engineered photoreceptors, *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.*, 105 (2013) 59–72.
- [141] M.J. Kennedy, R.M. Hughes, L.A. Peteya, J.W. Schwartz, M.D. Ehlers, C.L. Tucker, Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells, *Nat. Methods*, 7 (2010) 973–975.
- [142] T. Ziegler, A. Möglich, Photoreceptor engineering, *Front. Mol. Biosci.*, 2 (2015).
- [143] R.P. Diensthuber, M. Bommer, T. Gleichmann, A. Möglich, Full-length structure of a sensor histidine kinase pinpoints coaxial coiled coils as signal transducers and modulators, *Struct. Lond. Engl.* 1993, 21 (2013) 1127–1136.
- [144] J.M. Mason, K.M. Arndt, Coiled Coil Domains: Stability, Specificity, and Biological Implications, *ChemBioChem*, 5 (2004) 170–176.
- [145] K. König, Multiphoton microscopy in life sciences, *J. Microsc.*, 200 (2000) 83–104.
- [146] J. Mattis, K.M. Tye, E.A. Ferenczi, C. Ramakrishnan, D.J. O’Shea, R. Prakash, L.A. Gunaydin, M. Hyun, L.E. Fenno, V. Gradinaru, O. Yizhar, K. Deisseroth, Principles for applying optogenetic tools derived from direct comparative analysis of microbial opsins, *Nat. Methods*, 9 (2012) 159–172.
- [147] S. Shimizu-Sato, E. Huq, J.M. Tepperman, P.H. Quail, A light-switchable gene promoter system, *Nat. Biotechnol.*, 20 (2002) 1041–1044.
- [148] A. Levskaya, O.D. Weiner, W.A. Lim, C.A. Voigt, Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction, *Nature*, 461 (2009) 997–1001.
- [149] D.W. Leung, C. Otomo, J. Chory, M.K. Rosen, Genetically encoded photoswitching of actin assembly through the Cdc42-WASP-Arp2/3 complex pathway, *Proc Natl Acad Sci U A*, 105 (2008) 12797–802.
- [150] A.B. Tyszkiewicz, T.W. Muir, Activation of protein splicing with light in yeast, *Nat. Methods*, 5 (2008) 303–305.
- [151] M.-H. Ryu, M. Gomelsky, Near-infrared Light Responsive Synthetic c-di-GMP Module for Optogenetic Applications, *ACS Synth. Biol.*, (2014) 140128065111003.

- [152] A. Levskaya, A.A. Chevalier, J.J. Tabor, Z.B. Simpson, L.A. Lavery, M. Levy, E.A. Davidson, A. Scouras, A.D. Ellington, E.M. Marcotte, C.A. Voigt, Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light, *Nature*, 438 (2005) 441–442.
- [153] A.J. Fischer, N.C. Rockwell, A.Y. Jang, L.A. Ernst, A.S. Waggoner, Y. Duan, H. Lei, J.C. Lagarias, Multiple Roles of a Conserved GAF Domain Tyrosine Residue in Cyanobacterial and Plant Phytochromes†, *Biochemistry (Mosc.)*, 44 (2005) 15203–15215.
- [154] J. Zhang, X.-J. Wu, Z.-B. Wang, Y. Chen, X. Wang, M. Zhou, H. Scheer, K.-H. Zhao, Fused-Gene Approach to Photoswitchable and Fluorescent Biliproteins, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49 (2010) 5456–5458.
- [155] Y. Su, J.C. Lagarias, Light-Independent Phytochrome Signaling Mediated by Dominant GAF Domain Tyrosine Mutants of Arabidopsis Phytochromes in Transgenic Plants, *Plant Cell Online*, 19 (2007) 2124–2139.
- [156] A.J. Fischer, J.C. Lagarias, Harnessing phytochrome's glowing potential, *Proc Natl Acad Sci U A*, 101 (2004) 17334–9.
- [157] X. Shu, A. Royant, M.Z. Lin, T.A. Aguilera, V. Lev-Ram, P.A. Steinbach, R.Y. Tsien, Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome, *Science*, 324 (2009) 804–807.
- [158] Z. Gu, M. Zhao, Y. Sheng, L.A. Bentolila, Y. Tang, Detection of Mercury Ion by Infrared Fluorescent Protein and Its Hydrogel-Based Paper Assay, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 2324–2329.
- [159] L. Deforce, K. Tomizawa, N. Ito, D. Farrens, P.S. Song, M. Furuya, In vitro assembly of apophytochrome and apophytochrome deletion mutants expressed in yeast with phycocyanobilin, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 (1991) 10392–10396.
- [160] K. Müller, R. Engesser, J. Timmer, F. Nagy, M.D. Zurbriggen, W. Weber, Synthesis of phycocyanobilin in mammalian cells, *Chem. Commun.*, 49 (2013) 8970.
- [161] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Signal-Transduction Pathways: An Introduction to Information Metabolism*, (2002).
- [162] M. Gomelsky, cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all!, *Mol. Microbiol.*, 79 (2011) 562–565.
- [163] J.N. Marden, Q. Dong, S. Roychowdhury, J.E. Berleman, C.E. Bauer, Cyclic GMP controls *Rhodospirillum centenum* cyst development, *Mol. Microbiol.*, 79 (2011) 600–615.
- [164] S.-Q. An, K.-H. Chin, M. Febrer, Y. McCarthy, J.-G. Yang, C.-L. Liu, D. Swarbreck, J. Rogers, J. Maxwell Dow, S.-H. Chou, R.P. Ryan, A cyclic GMP-dependent signalling pathway regulates bacterial phytopathogenesis, *EMBO J.*, 32 (2013) 2430–2438.
- [165] M. Conti, J. Beavo, *Biochemistry and Physiology of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Essential Components in Cyclic Nucleotide Signaling*, *Annu. Rev. Biochem.*, 76 (2007) 481–511.
- [166] K. Omori, J. Kotera, Overview of PDEs and Their Regulation, *Circ. Res.*, 100 (2007) 309–327.
- [167] S.H. Francis, M.A. Blount, J.D. Corbin, Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions, *Physiol. Rev.*, 91 (2011) 651–690.
- [168] M.R. Meyer, A. Angele, E. Kremmer, U.B. Kaupp, F. Müller, A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97 (2000) 10595–10600.

- [169] J.Y. Altarejos, M. Montminy, CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12 (2011) 141–151.
- [170] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Glycogen Breakdown and Synthesis Are Reciprocally Regulated*, (2002).
- [171] J. Antunes-Rodrigues, M.D. Castro, L.L.K. Elias, M.M. Valença, S.M. McCANN, Neuroendocrine Control of Body Fluid Metabolism, *Physiol. Rev.*, 84 (2004) 169–208.
- [172] L.J. Ignarro, P.J. Kadowitz, The Pharmacological and Physiological Role of Cyclic GMP in Vascular Smooth Muscle Relaxation, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 25 (1985) 171–191.
- [173] G. McConnachie, L.K. Langeberg, J.D. Scott, AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter, *Trends Mol. Med.*, 12 (2006) 317–323.
- [174] H. Mou, R.H. Cote, The Catalytic and GAF Domains of the Rod cGMP Phosphodiesterase (PDE6) Heterodimer Are Regulated by Distinct Regions of Its Inhibitory Subunit, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 27527–27534.
- [175] F. Wunder, A. Tersteegen, A. Rebmann, C. Erb, T. Fahrig, M. Hendrix, Characterization of the First Potent and Selective PDE9 Inhibitor Using a cGMP Reporter Cell Line, *Mol. Pharmacol.*, 68 (2005) 1775–1781.
- [176] D. Baylor, How photons start vision, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93 (1996) 560–565.
- [177] L. Aravind, E.V. Koonin, The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases, *Trends Biochem. Sci.*, 23 (1998) 469–472.
- [178] H. Ke, H. Wang, Crystal Structures of Phosphodiesterases and Implications on Substrate Specificity and Inhibitor Selectivity, *Curr. Top. Med. Chem.*, 7 (2007) 391–403.
- [179] KamYJ Zhang, Crystal Structure of Phosphodiesterase Families and the Potential for Rational Drug Design, in: *Cycl. Nucleotide Phosphodiesterases Health Dis.*, CRC Press, 2006.
- [180] H. Wang, Y. Liu, J. Hou, M. Zheng, H. Robinson, H. Ke, Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104 (2007) 5782–5787.
- [181] R. Zoraghi, S.H. Francis, J.D. Corbin, Critical Amino Acids in Phosphodiesterase-5 Catalytic Site That Provide for High-Affinity Interaction with Cyclic Guanosine Monophosphate and Inhibitors†, *Biochemistry (Mosc.)*, 46 (2007) 13554–13563.
- [182] J.D. Corbin, S.H. Francis, Cyclic GMP Phosphodiesterase-5: Target of Sildenafil, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 13729–13732.
- [183] N. Yathindra, M. Sundaralingam, Conformations of cyclic 3',5'-nucleotides Effect of the base on the syn-anti conformer distribution, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56 (1974) 119–126.
- [184] H. Wang, H. Robinson, H. Ke, The Molecular Basis for Different Recognition of Substrates by Phosphodiesterase Families 4 and 10, *J. Mol. Biol.*, 371 (2007) 302–307.
- [185] W. Zhang, H. Ke, A.P. Tretiakova, B. Jameson, R.W. Colman, Identification of overlapping but distinct cAMP and cGMP interaction sites with cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A by site-directed mutagenesis and molecular modeling based on crystalline PDE4B, *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, 10 (2001) 1481–1489.
- [186] E.A. Salter, A. Wierzbicki, The Mechanism of Cyclic Nucleotide Hydrolysis in the Phosphodiesterase Catalytic Site, *J. Phys. Chem. B*, 111 (2007) 4547–4552.

- [187] I.V. Turko, S.H. Francis, J.D. Corbin, Potential Roles of Conserved Amino Acids in the Catalytic Domain of the cGMP-binding cGMP-specific Phosphodiesterase (PDE5), *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 6460–6466.
- [188] A. Iffland, D. Kohls, S. Low, J. Luan, Y. Zhang, M. Kothe, Q. Cao, A.V. Kamath, Y.-H. Ding, T. Ellenberger, Structural Determinants for Inhibitor Specificity and Selectivity in PDE2A Using the Wheat Germ *in Vitro* Translation System [†], *Biochemistry (Mosc.)*, 44 (2005) 8312–8325.
- [189] R.X. Xu, A.M. Hassell, D. Vanderwall, M.H. Lambert, W.D. Holmes, M.A. Luther, W.J. Rocque, M.V. Milburn, Y. Zhao, H. Ke, R.T. Nolte, Atomic Structure of PDE4: Insights into Phosphodiesterase Mechanism and Specificity, *Science*, 288 (2000) 1822–1825.
- [190] G. Scapin, S.B. Patel, C. Chung, J.P. Varnerin, S.D. Edmondson, A. Mastracchio, E.R. Parmee, S.B. Singh, J.W. Becker, L.H.T. Van der Ploeg, M.R. Tota, Crystal Structure of Human Phosphodiesterase 3B: Atomic Basis for Substrate and Inhibitor Specificity[†], *Biochemistry (Mosc.)*, 43 (2004) 6091–6100.
- [191] J.A. Beavo, S.H. Francis, M.D. Houslay, *Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Health and Disease*, CRC Press, 2006.
- [192] Y. Xiong, H.-T. Lu, Y. Li, G.-F. Yang, C.-G. Zhan, Characterization of a Catalytic Ligand Bridging Metal Ions in Phosphodiesterases 4 and 5 by Molecular Dynamics Simulations and Hybrid Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Calculations, *Biophys. J.*, 91 (2006) 1858–1867.
- [193] S. Liu, M.N. Mansour, K.S. Dillman, J.R. Perez, D.E. Danley, P.A. Aeed, S.P. Simons, P.K. LeMotte, F.S. Menniti, Structural basis for the catalytic mechanism of human phosphodiesterase 9, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105 (2008) 13309–13314.
- [194] W.K. Sonnenburg, D. Seger, K.S. Kwak, J. Huang, H. Charbonneau, J.A. Beavo, Identification of Inhibitory and Calmodulin-binding Domains of the PDE1A1 and PDE1A2 Calmodulin-stimulated Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 30989–31000.
- [195] E. Degerman, P. Belfrage, V.C. Manganiello, Structure, Localization, and Regulation of cGMP-inhibited Phosphodiesterase (PDE3), *J. Biol. Chem.*, 272 (1997) 6823–6826.
- [196] A. Banjac, U. Kurz, J.E. Schultz, The regulatory tandem domains of human phosphodiesterases 1 and 4 regulate a cyanobacterial adenylyl cyclase, *Cell. Signal.*, 24 (2012) 1479–1484.
- [197] P. Wang, P. Wu, R.W. Egan, M.M. Billah, Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution, *Gene*, 280 (2001) 183–194.
- [198] K. Matthiesen, J. Nielsen, Binding of cyclic nucleotides to phosphodiesterase 10A and 11A GAF domains does not stimulate catalytic activity, *Biochem. J.*, 423 (2009) 401–409.
- [199] T. Kanacher, A. Schultz, J.U. Linder, J.E. Schultz, A GAF-domain-regulated adenylyl cyclase from *Anabaena* is a self-activating cAMP switch, *EMBO J.*, 21 (2002) 3672–3680.
- [200] J. Pandit, M.D. Forman, K.F. Fennell, K.S. Dillman, F.S. Menniti, Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106 (2009) 18225–18230.

- [201] A.Y. Wu, X.-B. Tang, S.E. Martinez, K. Ikeda, J.A. Beavo, Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 37928–37938.
- [202] G.J. Rosman, T.J. Martins, W.K. Sonnenburg, J.A. Beavo, K. Ferguson, K. Loughney, Isolation and characterization of human cDNAs encoding a cGMP-stimulated 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase, *Gene*, 191 (1997) 89–95.
- [203] C. Russwurm, G. Zoidl, D. Koesling, M. Russwurm, Dual Acylation of PDE2A Splice Variant 3 TARGETING TO SYNAPTIC MEMBRANES, *J. Biol. Chem.*, 284 (2009) 25782–25790.
- [204] K. Domek-Łopacińska, J.B. Strosznajder, The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging, *Brain Res.*, 1216 (2008) 68–77.
- [205] R.S. Song, B. Massenburg, W. Wenderski, V. Jayaraman, L. Thompson, S.R. Neves, ERK regulation of phosphodiesterase 4 enhances dopamine-stimulated AMPA receptor membrane insertion, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110 (2013) 15437–15442.
- [206] R. Fischmeister, L.R.V. Castro, A. Abi-Gerges, F. Rochais, J. Jurevičius, J. Leroy, G. Vandecasteele, Compartmentation of Cyclic Nucleotide Signaling in the Heart The Role of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases, *Circ. Res.*, 99 (2006) 816–828.
- [207] L.R.V. Castro, I. Verde, D.M.F. Cooper, R. Fischmeister, Cyclic Guanosine Monophosphate Compartmentation in Rat Cardiac Myocytes, *Circulation*, 113 (2006) 2221–2228.
- [208] R.T. MacFarland, B.D. Zelus, J.A. Beavo, High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 136–142.
- [209] V.O. Nikolaev, S. Gambaryan, S. Engelhardt, U. Walter, M.J. Lohse, Real-time Monitoring of the PDE2 Activity of Live Cells HORMONE-STIMULATED cAMP HYDROLYSIS IS FASTER THAN HORMONE-STIMULATED cAMP SYNTHESIS, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 1716–1719.
- [210] J. Surapisitchat, K.-I. Jeon, C. Yan, J.A. Beavo, Differential Regulation of Endothelial Cell Permeability by cGMP via Phosphodiesterases 2 and 3, *Circ. Res.*, 101 (2007) 811–818.
- [211] R. Acin-Perez, M. Russwurm, K. Günnewig, M. Gertz, G. Zoidl, L. Ramos, J. Buck, L.R. Levin, J. Rassow, G. Manfredi, C. Steegborn, A Phosphodiesterase 2A Isoform Localized to Mitochondria Regulates Respiration, *J. Biol. Chem.*, 286 (2011) 30423–30432.
- [212] S.K. de Oliveira, M. Hoffmeister, S. Gambaryan, W. Muller-Esterl, J.A. Guimaraes, A.P. Smolenski, Phosphodiesterase 2A Forms a Complex with the Co-chaperone XAP2 and Regulates Nuclear Translocation of the Aryl Hydrocarbon Receptor, *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 13656–13663.
- [213] F. Wunder, M.J. Gnoth, A. Geerts, D. Barufe, A novel PDE2A reporter cell line: characterization of the cellular activity of PDE inhibitors, *Mol. Pharm.*, 6 (2009) 326–336.
- [214] J. Zhu, Q. Yang, D. Dai, Q. Huang, X-ray Crystal Structure of Phosphodiesterase 2 in Complex with a Highly Selective, Nanomolar Inhibitor Reveals a Binding-Induced Pocket Important for Selectivity, *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (2013) 11708–11711.

- [215] F.G. Boess, M. Hendrix, F.-J. van der Staay, C. Erb, R. Schreiber, W. van Staveren, J. de Vente, J. Prickaerts, A. Blokland, G. Koenig, Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance, *Neuropharmacology*, 47 (2004) 1081–1092.
- [216] J. Seybold, D. Thomas, M. Witzenrath, Ş. Boral, A.C. Hocke, A. Bürger, A. Hatzelmann, H. Tenor, C. Schudt, M. Krüll, H. Schütte, S. Hippenstiel, N. Suttorp, Tumor necrosis factor- α -dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability, *Blood*, 105 (2005) 3569–3576.
- [217] T. Suzuki, K. Moriya, K. Nagatoshi, Y. Ota, T. Ezure, E. Ando, S. Tsunasawa, T. Utsumi, Strategy for comprehensive identification of human N-myristoylated proteins using an insect cell-free protein synthesis system, *PROTEOMICS*, 10 (2010) 1780–1793.
- [218] S.E. Martinez, A.Y. Wu, N.A. Glavas, X.-B. Tang, S. Turley, W.G. Hol, J.A. Beavo, The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99 (2002) 13260–13265.
- [219] T. Mathes, C. Vogl, J. Stolz, P. Hegemann, In vivo generation of flavoproteins with modified cofactors, *J Mol Biol*, 385 (2009) 1511–8.
- [220] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227 (1970) 680–685.
- [221] T.R. Berkelman, J.C. Lagarias, Visualization of bilin-linked peptides and proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 156 (1986) 194–201.
- [222] M.J. Díaz Enrich, J.A. Villamarín, J.I. Ramos Martínez, I. Ibarguren, Measurement of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) by high-performance liquid chromatography with diode array detection, *Anal. Biochem.*, 285 (2000) 105–112.
- [223] T.J. Rink, R.Y. Tsien, T. Pozzan, Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes, *J. Cell Biol.*, 95 (1982) 189–196.
- [224] J.Y. Lin, M.Z. Lin, P. Steinbach, R.Y. Tsien, Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics, *Biophys. J.*, 96 (2009) 1803–1814.
- [225] B.S. Gan, E. Krump, L.D. Shrode, S. Grinstein, Loading pyranine via purinergic receptors or hypotonic stress for measurement of cytosolic pH by imaging, *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, 275 (1998) C1158–C1166.
- [226] C. Gasser, S. Taiber, C.-M. Yeh, C.H. Wittig, P. Hegemann, S. Ryu, F. Wunder, A. Möglich, Engineering of a red-light-activated human cAMP/cGMP-specific phosphodiesterase, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (2014).
- [227] D. Chen, J.D. Brown, Y. Kawasaki, J. Bommer, J.Y. Takemoto, Scalable production of biliverdin IX α by *Escherichia coli*, *BMC Biotechnol.*, 12 (2012) 89.
- [228] K. Mukougawa, H. Kanamoto, T. Kobayashi, A. Yokota, T. Kohchi, Metabolic engineering to produce phytochromes with phytochromobilin, phycocyanobilin, or phycoerythrobilin chromophore in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, 580 (2006) 1333–1338.
- [229] E.A. Rogulin, T.A. Perevyazova, L.A. Zheleznaya, N.I. Matvienko, Plasmid pRARE as a vector for cloning to construct a superproducer of the site-specific nickase NBspD6I, *Biochem. Biokhimiia*, 69 (2004) 1123–1127.
- [230] A.M. Baca, W.G.J. Hol, Overcoming codon bias: A method for high-level overexpression of Plasmodium and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli*, *Int. J. Parasitol.*, 30 (2000) 113–118.

- [231] L.M. Guzman, D. Belin, M.J. Carson, J. Beckwith, Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter, *J. Bacteriol.*, 177 (1995) 4121–4130.
- [232] A. Skerra, Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*, *Gene*, 151 (1994) 131–135.
- [233] T.G. Schmidt, A. Skerra, The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins, *Nat. Protoc.*, 2 (2007) 1528–1535.
- [234] K. Winkler, A. Schultz, J.E. Schultz, The S-helix determines the signal in a Tsr receptor/adenylyl cyclase reporter, *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 15479–15488.
- [235] M. Linke, Y. Yang, B. Zienicke, M.A.S. Hammam, T. von Haimberger, A. Zacarias, K. Inomata, T. Lamparter, K. Heyne, Electronic transitions and heterogeneity of the bacteriophytochrome Pr absorption band: An angle balanced polarization resolved femtosecond VIS pump-IR probe study, *Biophys. J.*, 105 (2013) 1756–1766.
- [236] T.J. Martins, M.C. Mumby, J.A. Beavo, Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues, *J. Biol. Chem.*, 257 (1982) 1973–1979.
- [237] T.C. Rich, T.E. Tse, J.G. Rohan, J. Schaack, J.W. Karpen, In Vivo Assessment of Local Phosphodiesterase Activity Using Tailored Cyclic Nucleotide-Gated Channels as Camp Sensors, *J. Gen. Physiol.*, 118 (2001) 63–78.
- [238] Y.M. Shuba, V.G. Naidenov, M. Morad, cAMP-dependent regulation of Ca²⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes, *Neurophysiology*, 29 (1997) 32–39.
- [239] H. M, T. T, F. A, F. R, I. O, T. T, N. K, Cardiovascular and adenylyl cyclase stimulant properties of NKH477, a novel water-soluble forskolin derivative, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 19 (1992) 625–634.
- [240] M. Stierl, Kleine Enzyme mit großer Perspektive, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, 2013.
- [241] G.S. Filonov, K.D. Piatkevich, L.-M. Ting, J. Zhang, K. Kim, V.V. Verkhusha, Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging, *Nat. Biotechnol.*, 29 (2011) 757–761.
- [242] B. Li, J.Y. Tom, D. Oare, R. Yen, W.J. Fairbrother, J.A. Wells, B.C. Cunningham, Minimization of a polypeptide hormone, *Science*, 270 (1995) 1657–1660.
- [243] E.S. Burgie, T. Wang, A.N. Bussell, J.M. Walker, H. Li, R.D. Vierstra, Crystallographic and Electron Microscopic Analyses of a Bacterial Phytochrome Reveal Local and Global Rearrangements During Photoconversion, *J. Biol. Chem.*, (2014).
- [244] M.-H. Ryu, I.-H. Kang, M.D. Nelson, T.M. Jensen, A.I. Lyuksyutova, J. Siltberg-Liberles, D.M. Raizen, M. Gomelsky, Engineering adenylyl cyclases regulated by near-infrared window light, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111 (2014) 10167–10172.
- [245] T. Mathes, J. Ravensbergen, M. Klotz, T. Gleichmann, K.D. Gallagher, N.C. Woitowich, R. St. Peter, S.E. Kovaleva, E.A. Stojković, J.T.M. Kennis, Femto- to Microsecond Photodynamics of an Unusual Bacteriophytochrome, *J. Phys. Chem. Lett.*, (2014) 239–243.
- [246] M. Ahmad, J.A. Jarillo, O. Smirnova, A.R. Cashmore, The CRY1 Blue Light Photoreceptor of *Arabidopsis* Interacts with Phytochrome A In Vitro, *Mol. Cell*, 1 (1998) 939–948.

- [247] R. Tasler, T. Moises, N. Frankenberg-Dinkel, Biochemical and spectroscopic characterization of the bacterial phytochrome of *Pseudomonas aeruginosa*, *FEBS J.*, 272 (2005) 1927–1936.
- [248] S. Bruder, A. Schultz, J.E. Schultz, Characterization of the Tandem GAF Domain of Human Phosphodiesterase 5 Using a Cyanobacterial Adenylyl Cyclase as a Reporter Enzyme, *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 19969–19976.
- [249] K. Hofbauer, A. Schultz, J.E. Schultz, Functional Chimeras of the Phosphodiesterase 5 and 10 Tandem GAF Domains, *J. Biol. Chem.*, 283 (2008) 25164–25170.
- [250] H. Takala, A. Björling, O. Berntsson, H. Lehtivuori, S. Niebling, M. Hoernke, I. Kosheleva, R. Henning, A. Menzel, J.A. Ihalainen, S. Westenhoff, Signal amplification and transduction in phytochrome photosensors, *Nature*, 509 (2014) 245–248.
- [251] H. Takala, A. Björling, M. Linna, S. Westenhoff, J.A. Ihalainen, Light-induced Changes in the Dimerization Interface of Bacteriophytochromes, *J. Biol. Chem.*, (2015) jbc.M115.650127.
- [252] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, Secondary Structure: Polypeptide Chains Can Fold Into Regular Structures Such as the Alpha Helix, the Beta Sheet, and Turns and Loops, (2002).
- [253] R.A. Ayers, K. Moffat, Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains, *Biochemistry (Mosc.)*, 47 (2008) 12078–12086.
- [254] M. Hulko, F. Berndt, M. Gruber, J.U. Linder, V. Truffault, A. Schultz, J. Martin, J.E. Schultz, A.N. Lupas, M. Coles, The HAMP domain structure implies helix rotation in transmembrane signaling, *Cell*, 126 (2006) 929–940.
- [255] K. Kanchan, J. Linder, K. Winkler, K. Hantke, A. Schultz, J.E. Schultz, Transmembrane Signaling in Chimeras of the *Escherichia coli* Aspartate and Serine Chemotaxis Receptors and Bacterial Class III Adenylyl Cyclases, *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 2090–2099.
- [256] H. Topal, N.B. Fulcher, J. Bitterman, E. Salazar, J. Buck, L.R. Levin, M.J. Cann, M.C. Wolfgang, C. Steegborn, Crystal Structure and Regulation Mechanisms of the CyaB Adenylyl Cyclase from the Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Mol. Biol.*, 416 (2012) 271–286.
- [257] J.U. Linder, J.E. Schultz, The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules, *Cell. Signal.*, 15 (2003) 1081–1089.
- [258] D.A. Ryjenkov, M. Tarutina, O.V. Moskvina, M. Gomelsky, Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain, *J. Bacteriol.*, 187 (2005) 1792–1798.
- [259] J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux, On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model, *J Mol Biol*, 12 (1965) 88–118.
- [260] J. Mehlhorn, H. Steinöcher, S. Beck, J.T.M. Kennis, P. Hegemann, T. Mathes, A Set of Engineered *Escherichia coli* Expression Strains for Selective Isotope and Reactivity Labeling of Amino Acid Side Chains and Flavin Cofactors, *PLoS ONE*, 8 (2013) e79006.
- [261] K. Evans, J.G. Grossmann, A.P. Fordham-Skelton, M.Z. Papiz, Small-angle X-ray scattering reveals the solution structure of a bacteriophytochrome in the catalytically active Pr state, *J. Mol. Biol.*, 364 (2006) 655–666.
- [262] J.J. Bozzola, L.D. Russell, *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*, Jones & Bartlett Learning, 1999.
- [263] B. Trivedi, R.H. Kramer, Real-Time Patch-Cram Detection of Intracellular cGMP Reveals Long-Term Suppression of Responses to NO and Muscarinic Agonists, *Neuron*, 21 (1998) 895–906.

- [264] A.J. Silva, J.H. Kogan, P.W. Frankland, S. Kida, Creb and Memory, *Annu. Rev. Neurosci.*, 21 (1998) 127–148.
- [265] R.H. Cote, Characteristics of Photoreceptor PDE (PDE6): similarities and differences to PDE5, *Int. J. Impot. Res.*, 16 (2004) S28–S33.
- [266] V. Jansen, L. Alvarez, M. Balbach, T. Strünker, P. Hegemann, U.B. Kaupp, D. Wachten, Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics, *eLife*, 4 (2015) e05161.
- [267] S.R. Schmidl, R.U. Sheth, A. Wu, J.J. Tabor, Refactoring and Optimization of Light-Switchable *Escherichia coli* Two-Component Systems, *ACS Synth. Biol.*, 3 (2014) 820–831.
- [268] L. Li, J.C. Lagarias, Phytochrome assembly in living cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91 (1994) 12535–12539.
- [269] G.A. Gambetta, J.C. Lagarias, Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98 (2001) 10566.
- [270] Y. Oka, T. Matsushita, N. Mochizuki, P.H. Quail, A. Nagatani, Mutant Screen Distinguishes between Residues Necessary for Light-Signal Perception and Signal Transfer by Phytochrome B, *PLoS Genet*, 4 (2008) e1000158.
- [271] R. Narikawa, T. Ishizuka, N. Muraki, T. Shiba, G. Kurisu, M. Ikeuchi, Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110 (2013) 918–923.
- [272] N.C. Rockwell, R. Ohlendorf, A. Möglich, Cyanobacteriochromes in full color and three dimensions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110 (2013) 806–807.
- [273] S. Chapman, C. Faulkner, E. Kaiserli, C. Garcia-Mata, E.I. Savenkov, A.G. Roberts, K.J. Oparka, J.M. Christie, The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection, *Proc Natl Acad Sci U A*, 105 (2008) 20038–43.
- [274] R. Zoraghi, J.D. Corbin, S.H. Francis, Phosphodiesterase-5 Gln817 Is Critical for cGMP, Vardenafil, or Sildenafil Affinity ITS ORIENTATION IMPACTS cGMP BUT NOT cAMP AFFINITY, *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 5553–5558.
- [275] S.D. Rybalkin, I.G. Rybalkina, M. Shimizu-Albergine, X.-B. Tang, J.A. Beavo, PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain, *EMBO J.*, 22 (2003) 469–478.
- [276] S.H. Soderling, J.A. Beavo, Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12 (2000) 174–179.
- [277] A. Rascón, S.H. Soderling, J.B. Schaefer, J.A. Beavo, Cloning and characterization of a cAMP-specific phosphodiesterase (TbPDE2B) from *Trypanosoma brucei*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99 (2002) 4714–4719.
- [278] R. Zoraghi, S. Kunz, K. Gong, T. Seebeck, Characterization of TbPDE2A, a Novel Cyclic Nucleotide-specific Phosphodiesterase from the Protozoan Parasite *Trypanosoma brucei*, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 11559–11566.
- [279] R. Ohlendorf, R.R. Vidavski, A. Eldar, K. Moffat, A. Möglich, From dusk till dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression, *J. Mol. Biol.*, 416 (2012) 534–542.
- [280] C.A. Rohl, C.E.M. Strauss, K.M.S. Misura, D. Baker, Protein Structure Prediction Using Rosetta, in: *Methods Enzymol.*, Elsevier, 2004: pp. 66–93.
- [281] I.P. Hohenfeld, A.A. Wegener, M. Engelhard, Purification of histidine tagged bacteriorhodopsin, pharaonis halorhodopsin and pharaonis sensory rhodopsin II functionally expressed in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, 442 (1999) 198–202.

- [282] A. Puustinen, M. Wikström, The heme groups of cytochrome o from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 (1991) 6122–6126.

Danksagung

Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Dissertationsschrift nicht veröffentlicht.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich auf Grundlage der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel die Dissertation selbstständig erarbeitet und verfasst habe.

Berlin, den

Carlos Fernando Gasser